

Aus dem Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät
Ludwig-Maximilians-Universität München

- Prof. Dr. Heidrun Potschka -

Prävention der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression durch COX-2-Inhibition

Inauguraldissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Guido Zibell aus Brühl im Rheinland

München, September 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Potschka
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Tag der Promotion: 6.Februar 2009

meiner Mutter

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Definition und Bedeutung von Epilepsien	2
2.2	Ursachen und Bedeutung der Pharmakoresistenz	4
2.2.1	Die Multidrug-Transporter Hypothese	6
2.2.2	P-Glycoprotein (Pgp) - eine Schlüsselrolle im Multidrug-Transport	9
2.3	Strategien zur Überwindung der transporterbasierten Pharmakoresistenz ..	13
2.3.1	Die Reduktion der MDR1-Genexpression	13
2.3.2	Die Modulation von Pgp durch Inhibition und endogene Substrate	14
2.3.3	Die Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Expression	16
3	Zielsetzung und Arbeitshypothese	27
4	Material und Methoden	29
4.1	Formulierung der applizierten COX-2-Hemmstoffe	29
4.1.1	Erstellen einer Celecoxib-Suspension	29
4.1.2	Erstellen einer NS-398 Suspension	31
4.2	Fraktioniertes Lithium-Pilocarpin-Modell	32
4.2.1	Versuchstiere	32
4.2.2	Versuchsaufbau	32
4.2.3	Beurteilung des Status epilepticus (SE)	35
4.2.4	Probengewinnung	36
4.2.5	Probenaufbereitung	36
4.3	Immunhistologie	37
4.3.1	Auswertung und Statistik	40
4.4	Verträglichkeitsuntersuchung der chronischen Celecoxib-Therapie	44
4.5	Die COX-2-Aktivität im SE Modell	44
4.6	Verwendete Substanzen	45

5	Ergebnisse	47
5.1	Celecoxib.....	47
5.1.1	Auslösung und Verlauf des Status epilepticus.....	47
5.1.2	Beeinflussung der Pgp-Expression.....	49
5.1.3	Verträglichkeitsuntersuchung der chronischen Celecoxib-Therapie	51
5.2	NS-398	51
5.2.1	Auslösung und Verlauf des Status epilepticus.....	51
5.2.2	Beeinflussung der Pgp-Expression durch NS-398.....	52
5.2.3	Beeinflussung der PGE ₂ -Synthese	56
6	Diskussion.....	57
6.1	Prävention der Pgp-Überexpression durch eine selektive COX-2-Hemmung.....	57
6.2	Die chronische Therapie mit Celecoxib	62
6.3	Die Verhinderung der hippocampalen PGE ₂ -Synthese durch NS-398	63
6.4	Schlussbetrachtung	65
7	Zusammenfassung.....	67
8	Summary.....	69
9	Literaturverzeichnis	71
10	Lebenslauf.....	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin Triphosphat
BCRP	Breast-Cancer-Resistance-Associated-Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CA-3	Cornu Anubis – 3 (Teil des Ammonshorns)
CEL	Cremophor EL
cm	Zentimeter
CNT	Konzentrierten-Nukleosid-Transporter
COX	Cyclooxygenase
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
d	Tag
DAB	3,3' Diaminobenzidin
DG	Gyrus Dentatus
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EEG	Elektroenzephalogramm
ENT	Equiliberativer-Nukleosid-Transporter
ET-1	Endothelin-1
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
H	Histamin
h	Stunde
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharid
MDT	Multidrug-Transporter
MEZ	Mitteuropäische Zeit
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MDR	Multidrug-Resistenz-Proteine
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug-Resistenz-assoziierte-Proteine
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm²	Mikroquadratmeter
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBD-CSA	fluoreszierendes Cyclosporin-A Derivat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NOS	Stickstoffoxid-Synthase
OAT	Organischer-Anion-Transporter
OATP	Organisches-Anion-Transporter-Polypeptid
OCT	Organischer-Kation-Transporter
OD	optische Dichte
Pgp	Phosphoryliertes Glycoprotein
PG	Prostaglandin
PGE₂	Prostaglandin-E ₂
PKC	Protein-Kinase-C
PLA₂	Phospholipase-A ₂
RNA	Radionuklidsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Sauerstoffradikale
s.c.	subkutan
s	Sekunde
siRNA	small (short) interfering RNA
SE	Status epilepticus
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
St.D.	Standard Deviation (Standardabweichung)
t_{1/2}	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
u.a.	und andere
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Epilepsie ist die häufigste chronische, neurologische Erkrankung bei Mensch und Tier. Die meist lebenslange Pharmakotherapie stellt neben der chirurgischen Entfernung des epileptischen Fokus derzeit die bedeutendste Möglichkeit zur Behandlung der Epilepsie dar. Doch kann nahezu einem Drittel aller Epilepsiepatienten durch den Einsatz von antikonvulsiven Wirkstoffen nicht ausreichend geholfen werden. Diese Patienten gelten als pharmakoresistent. Die Pharmakoresistenz führt zu einem unkontrollierbaren Anfallsgeschehen, was für den Menschen zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität führt. In der Veterinärmedizin folgt aus der Pharmakoresistenz hingegen sehr häufig die Euthanasie. Die Überexpression verschiedener Transportproteine wird für das Ausbleiben des Behandlungserfolges verantwortlich gemacht. Der wichtigste und meist untersuchte Transporter ist das phosphorylierte Glycoprotein (Pgp). Pgp ist in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke in der Lage, verschiedene Antiepileptika direkt in den Blutstrom zurück zu pumpen, wodurch diese ihren Wirkungsort nicht mehr erreichen können. In der Vergangenheit wurden verschiedene Strategien verfolgt, die Aktivität und Expression von Pgp zu beeinflussen.

Im Vorfeld dieser Arbeit gelang es unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit anderen internationalen Arbeitsgruppen in vitro die Mechanismen aufzuklären, welche die Überexpression von Pgp verursachen. Die anfallsinduzierte Freisetzung des erregenden Neurotransmitters Glutamat induziert eine verstärkte Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2), was letztlich zur Überexpression von Pgp führt. Folglich konnte durch die COX-2 in vitro ein Zwischenschritt identifiziert werden, der selektiv beeinflusst werden kann. Die vorliegende Arbeit dient dem Zweck, diese Ergebnisse im Tiermodell zu verifizieren. Dadurch würde in vivo erstmals ein praktikabler Weg identifiziert, die anfallsinduzierte Überexpression von Pgp zu verhindern.

2 Literaturübersicht

2.1 Definition und Bedeutung von Epilepsien

Der Begriff Epilepsie fasst eine Vielzahl von Krankheiten und Symptomen zusammen, die durch das wiederholte und spontane Auftreten von Anfällen zentralen Ursprungs gekennzeichnet sind (FRÖSCHER 2004). Durch eine beständige Prädisposition kommt es zur klinischen Manifestation von plötzlich auftretenden, auch vorübergehenden, spontanen Entladungen von Nervenzellgruppen im Großhirn und in Folge dessen zur Ausprägung epileptischer Anfälle. Der Verlauf ist chronisch und kann progressiv sein (LOSCHER u. POTSCHKA 2005a).

Nach dem Schlaganfall ist die Epilepsie die zweithäufigste neurologische Erkrankung beim Menschen und die häufigste chronische neurologische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Menschen und Tieren (v.a. Hunden und Katzen) (LÖSCHER 1994; HAUSER 1999). Mit einer Prävalenz von 1-2% leiden weltweit ca. 60 Millionen Menschen an Epilepsie, wobei ca. 85% der Epilepsiepatienten, die in den Entwicklungsländern leben, häufig keine Therapie erhalten (BROWNE u. HOLMES 2001; KWAN u. SANDER 2004). Sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz der Epilepsie steigen mit zunehmendem Alter der Patienten an (BROWNE u. HOLMES 2001). Die Symptomatik von Epilepsien in der Veterinärmedizin ähnelt der des Menschen, wobei bei Hunden und Katzen auch eine vergleichbare Häufigkeit wie in der Humanmedizin beobachtet wird. (LECOUTEUR u. CHILD 1989; LOSCHER 2003).

Sobald die Diagnose Epilepsie vorliegt, wird die Art der Anfälle bestimmt, da für eine erfolgreiche Therapie die Klassifikation von großer Bedeutung ist. Epileptische Syndrome und epileptische Anfälle werden nach dem Anfallsmuster, dem Alter bei Krankheitsbeginn, anhand des elektroenzephalographischen Befundes, der Ursache und dem auslösenden Faktor klassifiziert.

Nach dem Anfallsmuster werden lokalisationsbezogene, sogenannte fokale Anfälle von generalisierten, meistens mit Bewusstseinsverlust einhergehenden Anfällen unterschieden. Fokale Anfälle beginnen mit motorischen, sensorischen, autonomen und psychischen Symptomen. Anhand der motorischen Funktionsstörungen werden generell tonische, klonische, tonisch-klonische, atonische oder myoklonische Funktionsstörungen unterschieden. Anhand der Lokalisation der Anfallsentstehung

werden fokale Anfälle in elementar-fokale, partial-komplexe und hemilaterale Anfälle unterteilt. Fokale Anfälle können sekundär generalisieren. Während elementar-fokale Anfälle das Bewusstsein nicht beeinträchtigen, führen partial-komplexe, hemilaterale und sekundär generalisierende fokale Anfälle zu Bewusstseinsbeeinträchtigung bis hin zur Bewusstlosigkeit. Der komplex-fokale Anfall mit oder ohne sekundäre Generalisierung ist die häufigste Anfallsform des Menschen (HAUSER et al. 1993). Etwa 70-80% der komplex-fokalen Anfälle beginnen im Temporallappen (vor allem im Hippocampus und der Amygdala), weswegen diese Epilepsieform auch als Temporallappenepilepsie bezeichnet wird (REGESTA u. TANGANELLI 1999). Analog zum Menschen generalisieren bei Hund und Katze die meisten Anfälle sekundär zu tonisch-klonischen Krämpfen (LOSCHER 2003).

Generalisierte Anfälle beginnen häufig mit bilateralen myoklonischen Zuckungen. Es sind für gewöhnlich primär generalisierende tonisch-klonische Anfälle und Absencen (BROWNE u. HOLMES 2001). Der Status epilepticus (SE), eine mit Bewusstseinsverlust assoziierte, anhaltende Anfallsaktivität, wird zudem vom Gelegenheitsanfall und der Anfallsserie unterschieden.

Die genaue Lokalisation des Anfallsfokus kann durch einen elektroenzephalographischen (EEG) Befund abgeklärt werden. EEG Befunde geben neben der Diagnose einer anormalen elektrischen Aktivität weiterhin Aufschluss über den Typ der Anfallserkrankung. Jedoch zeigt bei näherungsweise 50% der Epilepsiepatienten ein einzelnes Enzephalogramm keine Veränderungen (BROWNE u. HOLMES 2001).

Eine weitere Unterteilung der Epilepsie (symptomatische, idiopathische und kryptogene) richtet sich nach deren Ätiologie (commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy 1989). Einem großen Anteil der Epilepsien liegen symptomatische Ursachen zugrunde. Diese als initialer Insult bezeichneten Ursachen können Traumata, Fieberkrämpfe, Schlaganfälle, Enzephalitis, perinatale Hypoxien oder Tumore sein (STEFAN et al. 2006). Dadurch werden Prozesse eingeleitet, die zur Generierung eines prokonvulsiven neuronalen Netzwerkes führen. Die genauen Abläufe dieses als Epileptogenese bezeichneten Prozesses sind jedoch weitgehend unklar.

2.2 Ursachen und Bedeutung der Pharmakoresistenz

Die chronische, häufig lebenslange Therapie mit Antiepileptika stellt nach wie vor die bedeutendste Therapieform der Epilepsie dar. Die Auswahl des AEDs richtet sich hauptsächlich nach der Effektivität für den bestimmten Anfallstyp, der Verträglichkeit und der Sicherheit (BROWNE u. HOLMES 2001). Ein Therapieerfolg bei Epilepsie ist im Idealfall das Erreichen der Anfallsfreiheit, jedoch mindestens eine 50%ige Reduktion der Anfallsfrequenz ohne die normalen Gehirnfunktionen zu beeinträchtigen. Dieser Therapieerfolg kann bei nahezu 60% der Epilepsiepatienten erreicht werden (REGESTA u. TANGANELLI 1999; LOSCHER u. POTSCHKA 2002).

Auch wenn es bisher keine einheitliche Definition der Pharmakoresistenz bei Epilepsien gibt, gelten Epilepsiepatienten als klinisch pharmakoresistent, wenn nach Behandlung mit zwei bis drei AEDs der ersten Wahl kein Therapieerfolg erzielt werden kann. Trotz des optimalen Einsatzes moderner Antiepileptika, wird der Therapieerfolg bei mehr als 30% aller Epilepsiepatienten nicht erreicht. Daher stellt die Pharmakoresistenz ein schwerwiegendes Problem in der Behandlung der Epilepsie dar (POTSCHKA et al. 2004; STEFAN et al. 2006).

Patienten mit Temporallappenepilepsie leiden mit einer Prävalenz von nahezu 70% am häufigsten unter einer pharmakoresistenten Epilepsie (ARONICA et al. 2003). Die pharmakoresistente Epilepsie tritt außerdem gehäuft bei Patienten auf, die bereits vor dem ersten Lebensjahr an einer Epilepsie erkrankt sind, oder bei denen wiederholt Fieberkrämpfe aufgetreten sind. Eine schlechte Prognose weisen zudem Patienten auf, die bereits vor Behandlungsbeginn eine hohe Anfallsfrequenz aufwiesen, oder bei denen corticale Entwicklungsstörungen als Epilepsie auslösende Ursache diagnostiziert wurden. (REGESTA u. TANGANELLI 1999).

Unkontrollierbare Anfälle schränken vor allem beim Menschen die Lebensqualität erheblich ein. Der Verlust der Fahrerlaubnis und des Arbeitsplatzes sowie Einschränkungen hinsichtlich fast aller Sportarten verstärken dieses Bild (BROWNE u. HOLMES 2001). In der Veterinärmedizin führt die pharmakoresistente Epilepsie hingegen häufig zur Euthanasie (LOSCHER 2003). Auch wenn zwischen 1990 bis 2006 insgesamt 16 neue Antiepileptika zugelassen worden sind und somit die Zahl verfügbarer Antiepileptika ständig steigt, war im Jahr 2005 nach einer Langzeitstudie mit 780 Patienten noch keine Trendwende hinsichtlich der Pharmakoresistenz bei Epilepsie zu beobachten (STEFAN et al. 2006). Die eingehende Untersuchung der

Mechanismen der Pharmakoresistenz ist daher wesentlich für die Entwicklung neuer Strategien zur Prophylaxe und Behandlung pharmakoresistenter Epilepsien.

Bei der Pharmakoresistenz handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, dem genetische, krankheits- und pharmakotherapiebedingte Faktoren zugrunde liegen (LOSCHER u. POTSCHKA 2002; STEINLEIN 2004). Genetische Faktoren wie Polymorphismen sind in der Lage, die unterschiedliche Pharmakosensitivität vergleichbarer Patienten zu erklären. Zu den bedeutenden krankheitsbedingten Faktoren zählen die Ätiologie, die fortschreitende Anfallsaktivität während der Pharmakotherapie, die Veränderungen in der Zielstruktur der Antiepileptika und die Veränderungen hinsichtlich der Aufnahme der Antiepileptika durch die Blut-Hirn-Schranke. Krankheitsbedingte Faktoren sind außerdem abnorme neuronale Verknüpfungen („epileptic circuitry“), die während der Epileptogenese entstehen, sowie neurodegenerative Veränderungen im epileptischen Fokus (REGESTA u. TANGANELLI 1999; LOSCHER u. POTSCHKA 2002).

Ferner kann es nach initialem Therapieerfolg zu einer Effektivitätsabnahme des Antiepileptikums während der Behandlung kommen. Man spricht bei diesem Phänomen von einer Toleranzentwicklung. Da bis auf Levetiracetam alle Wirkstoffe anhand der gleichen Screening-Tests entwickelt wurden, ist die Palette an unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der Antiepileptika wahrscheinlich nicht ausreichend (STEFAN et al. 2006). Sowohl die Toleranzentwicklung als auch eine zu geringe Wirkungseffektivität sind als pharmakotherapiebedingte Faktoren am multifaktoriellen Geschehen der Pharmakoresistenz beteiligt. (LOSCHER u. POTSCHKA 2002).

Patienten mit refraktärer Epilepsie sind gegenüber verschiedenen häufig allen Antiepileptika resistent (REGESTA u. TANGANELLI 1999). Daraus resultiert, dass Patienten, die auf das Antiepileptikum der ersten Wahl nicht ansprechen, mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 10% auf andere Antiepileptika ansprechen (LOSCHER u. POTSCHKA 2002).

In der Vergangenheit wurden insbesondere zwei Hypothesen formuliert, die die Pharmakoresistenz erklären könnten, die Drug-Target-Hypothese und die Multidrug-Transporter-Hypothese (MDT-Hypothese) (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b). Bei der Drug-Target-Hypothese wird davon ausgegangen, dass durch die Veränderung der Zielstruktur bei therapieresistenten Epilepsiepatienten das Pharmakon an seinem Zielort nur eine Teilwirkung oder gar keine Wirkung entfalten kann. So konnte im Gewebe epileptischer Patienten eine Veränderung der GABA-Rezeptoren hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Verteilung und Sensitivität gefunden werden (KWAN u. BRODIE 2002). Zudem sind Veränderungen der Eigenschaften von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen im Hippocampus epileptischer Patienten beschrieben worden (BECK et al. 1999; STEFAN et al. 2006). Da verschiedene Antiepileptika bei pharmakoresistenten Patienten trotz unterschiedlicher Wirkungsmechanismen keine ausreichende Wirkung aufweisen, kann die Drug-Target-Hypothese alleine das Auftreten der Pharmakoresistenz jedoch nicht erklären.

2.2.1 Die Multidrug-Transporter Hypothese

Die Aufnahme von Substanzen ins Gehirn ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, darunter der Affinität der Substanzen zu den Transportsystemen der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke. Diese Faktoren beeinflussen die Verteilung von Substanzen im Gehirn und folglich deren pharmakologische Effektivität. Generell hängt die Gehirngängigkeit einer Substanz von deren Lipidlöslichkeit ab. Je lipidlöslicher ein Molekül oder Pharmakon ist, desto leichter gelangt es ins Gehirngewebe. Allerdings weisen viele lipidlösliche Moleküle eine geringere Permeabilität auf als durch ihre lipidlöslichen Eigenschaften zu erwarten wäre. Diese Moleküle sind Substrate der sogenannten Multidrug-Transporter (CORNFORD u. HYMAN 1999; PARDRIDGE 1999; TSUJI u. TAMAI 1999; SEGAL 2000; SPECTOR 2000; GRAFF u. POLLACK 2004; LOSCHER u. POTSCHKA 2005b).

Multidrug-Transporter sind im Gehirn luminal und/oder basolateral in den Endothelzellen der Kapillaren lokalisiert. Ihre physiologische Funktion ist der zielgerichtete energieabhängige Effluxtransport toxischer Fremdstoffe (Xenobiotika) zum Schutz des Gehirnparenchyms. Dadurch kann die Nettopenetration von Trägersubstanzen und anderen Substraten, die vom Blut ins Gehirngewebe eindringen signifikant abgesenkt werden. Multidrug-Transporter spielen somit eine

wichtige Rolle in der Funktion der Blut-Hirn-Schranke. (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b). Neben ihrer Expression im Gehirn werden Multidrug-Transporter auch von anderen Geweben und Organen wie der Leber und der Niere exprimiert. Sie haben somit generell einen großen Einfluss auf die Absorption, Distribution und Elimination von pharmazeutischen Substanzen (FROMM 2000). Dadurch zählen sie zu den wichtigsten Zellproteinen (BAUER et al. 2005).

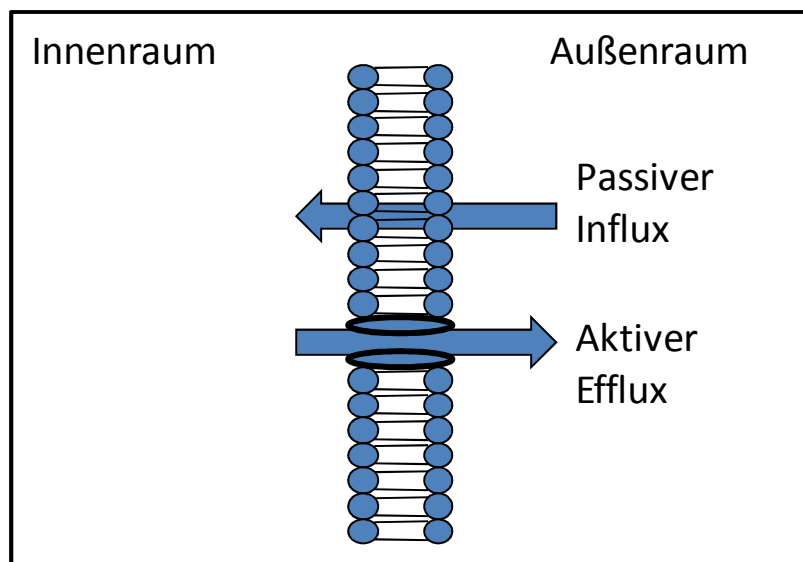


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des aktiven Transportes lipophiler Moleküle von Multidrug-Transportern durch die Zellmembran. Dargestellt sind der energieabhängige Effluxtransport von Substanzen gegen den Konzentrationsgradienten und der Influxtransport von Molekülen mittels Diffusion durch die Zellmembran, die als Lipiddoppelschicht schematisch dargestellt ist.

Die Multidrug-Transporter Hypothese postuliert, dass die Antiepileptika ihren Zielort im Gehirn aufgrund dieser membranständigen und multispezifischen Effluxtransporter nicht erreichen können. Sie spielen folglich eine entscheidende Rolle beim Ausbleiben des Behandlungserfolges bei Epilepsien (POTSCHKA et al. 2004).

Konventionell werden die Multidrug-Transporter basierend auf ihrer molekularen und funktionellen Eigenschaften in Familien eingeteilt. Derzeit unterscheidet man Organische-Anion-Transporter (OATs), Multidrug-Resistenz-assoziierte-Proteine (MRPs), Multidrug-Resistenz-Proteine (MDRs), Organische-Anion-Transporter-Polypeptide (OATPs), den Organischen-Kation-Transporter (OCT), den Konzentrierten-Nukleosid-Transporter (CNT) und den Equilibrativen-Nukleosid-Transporter (ENT), die in neuronalen kapillären Endothelzellen nachgewiesen worden sind (ZHANG et al. 2000; ZHANG et al. 2004; BAUER et al. 2005). Es ist wahrscheinlich, dass diese Aufstellung an Transportern noch nicht vollständig ist. Von den 15 auf mRNA Ebene entdeckten Transportern konnten bislang acht in den kapillaren Endothelzellen des Gehirns immunhistologisch nachgewiesen werden (BAUER et al. 2005).

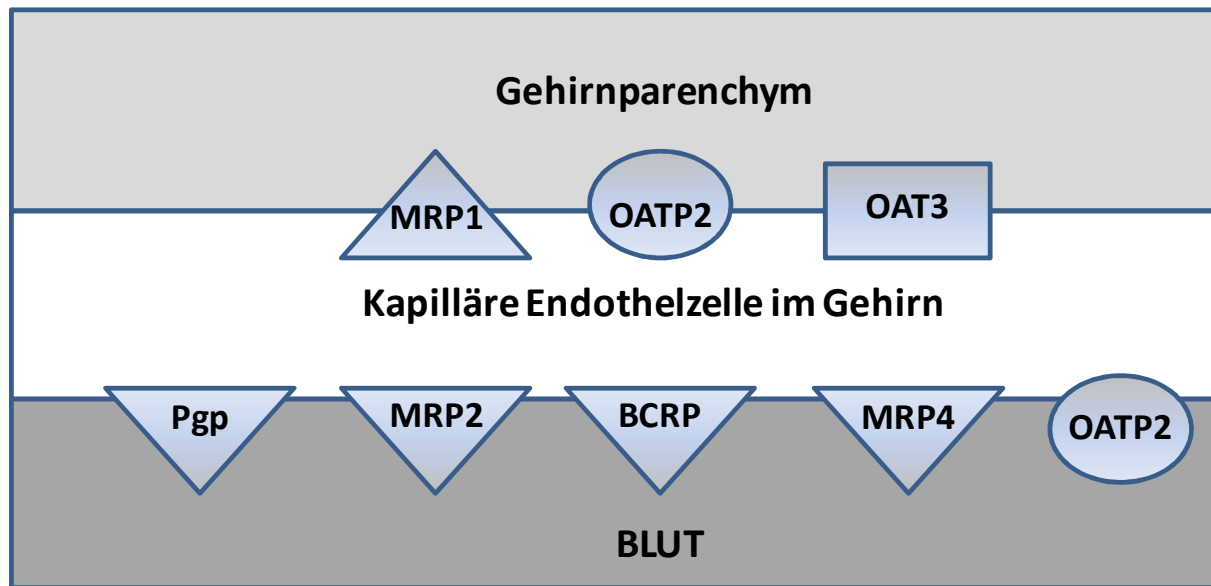


Abbildung 2.2 Schematische Verteilung von MDT an der Blut-Hirn-Schranke Organischer-Anion-Transporter (OAT), Multidrug-Resistenz-Assoziiertes Protein (MRP), P-Glycoprotein (Pgp), Organisches-Anion-Transport-Polypeptid (OATP), Brustkrebs-Resistenz-assoziiertes Protein (BCRP). Es sind jene Transporter dargestellt, deren Lokalisation bekannt ist (Modifiziert nach BAUER et al. 2005).

Auf der luminalen Seite der kapillaren Endothelzellen des Gehirns befinden sich das als P-Glycoprotein (Pgp) bezeichnete MDR1, das Breast-Cancer-Resistance-Associated-Protein (BCRP), MRP2 und MRP4 (Abbildung 2.2). Unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) transportieren sie anionische (MRP2 und MRP4), kationische (Pgp und BCRP) und ungeladene (alle vier) Xenobiotika. Durch den Verbrauch von ATP wird die entsprechende Transporterfamilie auch als ATP-binding-cassette (ABC)-Transporter bezeichnet (JONES u. GEORGE 2004; HO u. KIM 2005). An der luminalen Membran befindet sich außerdem OATP2, ein weiterer organischer Anion-Transporter, der Steroide und Konjugate, verschiedene Opioidpeptide und das Glycosid Digoxin transportiert (MEIER u. STIEGER 2002). Wahrscheinlich bilden diese fünf Transporter die selektiven Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke (BAUER et al. 2005). Doch auch in der basolateralen Plasmamembran der kapillaren Endothelzellen sind Fremdstofftransporter lokalisiert. Dazu zählen MRP1, OATP2 und OAT3 (Abbildung 2.2). Die Funktion dieser Transporter ist noch nicht ausreichend nachgewiesen. In Verbindung mit dem geeigneten Ionengradienten, können sowohl OAT3 als auch OATP2 organische Anionen in die Endothelzellen transportieren. So könnten die basale OATP2 und OAT3 zusammen mit der luminalen MRP2 und OATP2 anionische Fremdstoffe durch das Endothel direkt vom ZNS ins Blut befördern (BAUER et al. 2005).

2.2.2 P-Glycoprotein (Pgp) - eine Schlüsselrolle im Multidrug-Transport

1989 wurde Pgp (ABCB1) als erster ABC-Transporter in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke detektiert (CORDON-CARDO et al. 1989). Seitdem zählt es zu den meist untersuchten Multidrug-Transportern (SARKADI et al. 2006). Pgp wurde nicht nur in verschiedenen Säugetieren wie Primaten, Nagern, Rindern und Schweinen sondern auch in Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln detektiert (BAUER et al. 2005; LOSCHER u. POTSCHKA 2005a). Außer in den Endothelzellen des Gehirns wird Pgp in den Endothelzellen des Hodens und der Plazenta, im unteren Gastrointestinaltrakt, dem proximalen Tubulus der Niere, den canaliculären Membranen der Hepatozyten, in CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen und CD56⁺ Abwehrzellen exprimiert (SARKADI et al. 2006; TEODORI et al. 2006).

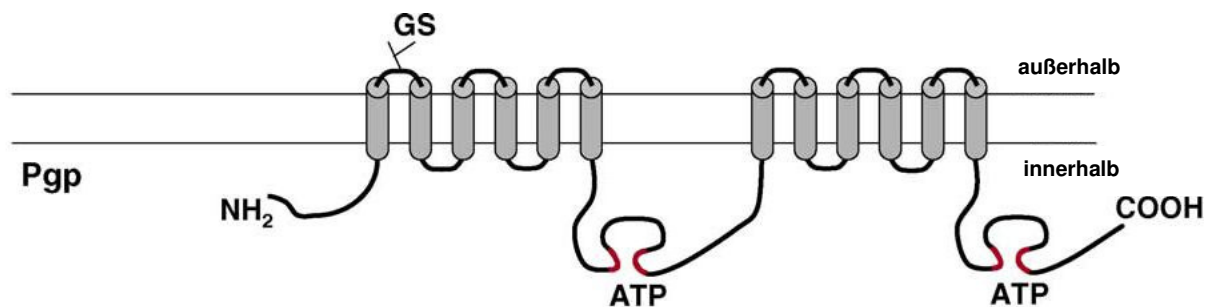


Abbildung 2.3: Vereinfachte Darstellung von Pgp. Dargestellt sind die transmembranen Segmente, die glycosylierende Seite (GS) und die Adenosintriphosphat (ATP) bindende Seite. Es handelt sich um eine schematische Darstellung, da in der Realität die transmembranen Segmente dichter zusammen rücken und ein kompaktes Molekül formen (modifiziert nach LOSCHER u. POTSCHKA 2005b).

MDR1 (Typ-I) und MDR2 (Typ-II) kodieren die beiden Isoformen des phosphorylierten Glycoproteins (Pgp) im Menschen. Typ-II scheint dabei ausschließlich in den Membranen der Hepatozyten lokalisiert zu sein, wohingegen MDR1 an den Blut-Gewebe Schranken lokalisiert ist (DEMEULE et al. 2002; BAUER et al. 2005).

Bei Nagern wird Pgp von den drei Isoformen *mdr1a*, *mdr1b* und *mdr2* kodiert. (DANO 1973; JULIANO u. LING 1976; BAUER et al. 2005). Nur *mdr1a* und *mdr1b* sind im Nagergehirn lokalisiert. Prinzipiell finden sie sich an der luminalen (apikalen) Membran der kapillaren Endothelzellen, was mittels in situ Hybridisation, Immunhistochemie, konfokaler Lasermikroskopie und Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnte (DEMEULE et al. 2002). Während *mdr1a* in den

Gehirnkapillaren aller Gehirnregionen zu finden ist, kann *mdr1b* ausschließlich im Gehirnparenchym und überwiegend im Hippocampus detektiert werden (DEMEULE et al. 2002; KWAN et al. 2003). Da beide Isoformen zusammen wie das einzelne menschliche MDR1-Gen exprimiert werden (SCHINKEL 1999), werden *mdr1a* und *mdr1b* im Folgenden nicht mehr differenziert.

Durch den zielgerichteten Auswärtstransport seiner Substrate unterbindet Pgp die ungehinderte Diffusion vieler lipophiler und potentiell toxischer Substanzen in verschiedenen Zellen und Geweben, auch entgegen eines hohen Konzentrationsgradienten (LITMAN et al. 2001; BAUER et al. 2005). Zu den Substraten von Pgp zählen neben endogenen Substraten wie Zytokinen, Steroiden und Bilirubin auch viele Arzneistoffe (Tabelle 1) (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b). In der Blut-Hirn-Schranke übernimmt Pgp durch seine Potenz, seine Lokalisation und die breite Substratspezifität eine Schlüsselfunktion in der Blut-Hirn-Schranke und bestimmt dadurch den Eintritt von Arzneistoffen ins ZNS (BEGLEY 2004; LOSCHER u. POTSCHKA 2005a). So handelt es sich bei dem weitverbreiteten Anthelmintikum Ivermectin zum Beispiel um ein hochaffines, neurotoxisches Pgp-Substrat (SCHINKEL et al. 1995). Die Behandlung von *mdr1a*-Knockout Mäusen mit Ivermectin führte aufgrund der 10-100fachen Steigerung der Nettopenetration ins Gehirn zu einer dramatischen Erhöhung der Neurotoxizität (SCHINKEL 1999). Auch die Ivermectin-Unverträglichkeit von einigen Collies und Hütehunden ist auf einen genetischen Defekt des MDR1-Proteins zurückzuführen (MEALEY et al. 2001; NELSON et al. 2003).

Viele Antiepileptika wie Phenytoin, Carbamazepin, Lamotrigin, Phenobarbital, Felbamat und Gabapentin sind als Substrate für Pgp beschrieben worden (Tabelle 1). Nachdem eine Beteiligung von Pgp an der Pharmakoresistenz von Krebszellen bereits 1970 erkannt wurde (JULIANO u. LING 1976), könnte der zielgerichtete Auswärtstransport von Antiepileptika zudem an der Ausbildung pharmakoresistenter Epilepsien beteiligt sein (LOSCHER u. POTSCHKA 2002; BAUER et al. 2005). Denn selbst unterschiedliche Wirkungsmechanismen verschiedener Antiepileptika bleiben letztendlich ineffektiv, sofern die Antiepileptika ihren Wirkungsort aufgrund eines zielgerichteten Auswärtstransports nicht erreichen können.

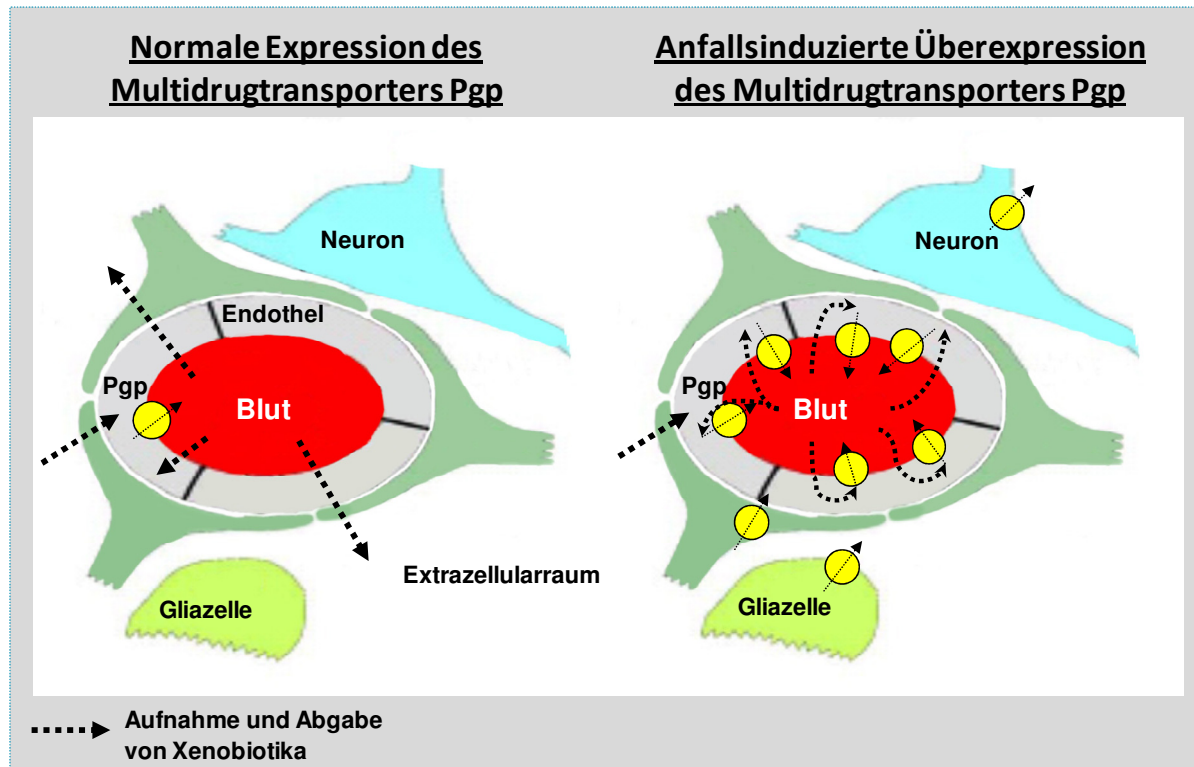


Abbildung 2.4 Auswirkung der Überexpression von Pgp auf den Fremdstofftransport. Pgp kommt in den Endothelzellen der Gehirnkapillaren physiologisch vor. Es transportiert verschiedene Fremdstoffe (Xenobiotika) darunter auch zahlreiche Antiepileptika und schützt das Gehirn dadurch vor potentiell toxischen Substanzen. Bei pharmakoresistenten Patienten ist eine Überexpression von Pgp zu beobachten, wodurch die Nettopenetration von Antiepileptika abgesenkt wird (modifiziert nach LOSCHER u. POTSCHKA 2005b).

Aufgrund des physiologischen Vorkommens von Pgp, muss es allerdings erst zu einer Veränderung in der Pgp-Expression kommen, da nur ein Teil der Epilepsiepatienten als pharmakoresistent gilt. Tatsächlich wurde bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten eine Überexpression des MDR1-Gens beobachtet, die von Tishler et al. (1995) erstmalig beschrieben wurde (TISHLER et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass sich diese Überexpression insbesondere in Regionen zeigt, die an der Anfallsgeneration und -ausbreitung beteiligt sind (VAN VLIET et al. 2006). In Folge dessen können Antiepileptika ihren Wirkungsort nicht mehr erreichen. Im Falle einer Überexpression bleibt die Pgp-Expression nicht nur auf die Endothelzellen der Gehirnkapillaren beschränkt, sondern ist auch in parenchymalen und perivaskulären Astrozyten und zusätzlich in Neuronen zu beobachten, die normalerweise kein Pgp exprimieren. Durch die Expression von Transportern in neuronalen Zellen verringert sich zusätzlich die Nettopenetration dieser Substanzen ins Gehirn (LOSCHER u. POTSCHKA 2002, 2005a)

Familie	Wirkstoffe
Anthelmintika	z.B. Ivermectin, Abamectin
Antibiotika	z.B. Erythromycin, Valinomycin, Rifampicin, Tetracyclin, Fluoroquinolon
Antidepressiva	z.B. Amitryptilin, Nortryptilin, Doxepin, Venlafaxin, Paroxetin
Antiepileptika	z.B. Phenytoin, Carbamazepin, Lamotrigin, Phenobarbital, Felbamat, Gabapentin, Topiramat
Antineoplastische Agentien	z. B. Taxane, Vinca-Alkaloide, Anthrazycline, Imatinib, Lonafernib
Antipsychotische Agentien	z.B. Olanzapin, Amisulprid
β -Adrenoceptor Antagonisten	z.B. Carvedilol, Celiprolol, Talinolol, Bunitrolol, Carazolol
Ca ²⁺ -Kanal-Blocker	z.B. Verapamil, Diltiazem, Mibefracil, Nifedipidine, Nitrendipine, Felodipin
Corticoide	z.B. Dexamethason, Hydrocortison, Corticosteron, Cortisol, Prednisolon, Aldosteron
Cytokine	z.B. IL-2, IL-4 IFN- γ
Herzglycoside	z.B. Digoxin, Digitoxin
H1-Rezeptor Antagonisten	z.B. Cetirizin, Fexofenadin, Terfenadin
H2-Rezeptor Antagonisten	z.B. Cimetidin
HIV-Protease Hemmern	z.B. Amprenavir, Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir, Lopinavir
Immunsuppressive Agentien	z.B. Cyclosporin A und Derivate, Tacrolimus (FK506) und Derivate, Sirolimus (Rapamycin) und Derivate
Lipidabsenkende Agentien	z.B. Lovastatin, Cerivastatin, Atorvastatin
Opioide	z.B. Morphin-6-glucuronide, Methadone, Loperamid, Fentanyl, Asimadoline
Zytostatika	z.B. Doxorubicin, Daunorubicin, Idarubicin, Epirubicin, Vinblastin, Vincristin, Etoposid, Teniposid

Tabelle 1: Substrate von Pgp. Aufgelistet sind Wirkstofffamilien und Wirkstoffe, die als Substrate für Pgp nachgewiesen werden konnten (BAUER et al. 2005; LOSCHER u. POTSCHKA 2005b)

2.3 Strategien zur Überwindung der transporterbasierten Pharmakoresistenz

Die Beeinflussung der Pgp-Funktion an der Blut-Hirn-Schranke stellt folglich einen Weg dar, die Penetration einer großen Anzahl von Arzneistoffen ins Gehirn kontrolliert zu steigern. Vorangegangene Studien an anderen Geweben haben gezeigt, dass die Möglichkeit besteht, die Pgp-Aktivität zu beeinflussen. Dazu kann eine Reduktion der MDR1-Genexpression, eine Modulation von Pgp durch Inhibition und endogene Substrate, sowie die Prävention der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression erfolgen (BEGLEY 2004; BAUER et al. 2005).

2.3.1 Die Reduktion der MDR1-Genexpression

Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht eine schnelle Identifizierung und Validierung therapeutisch relevanter Genfunktionen sowie Stoffwechselwege und somit die Entwicklung neuer Angriffspunkte für Arzneimittel (NOVINA u. SHARP 2004). Bei der RNAi handelt es sich um einen natürlich vorkommenden Mechanismus zur Gen-Regulation. Sie setzt sich aus zwei intrazellulär ablaufenden Teilprozessen zusammen, die letztendlich zur Erkennung und Zerstörung einer Ziel-mRNA führen, wodurch Transkriptionsprozesse verhindert werden können (FIRE et al. 1998; UPRICHARD 2005). An Tumorzellen konnte die Effektivität der RNAi zur Behandlung der Pgp-vermittelten Pharmakoresistenz gezeigt werden. Der Einsatz einer *mdr1*-orientierten RNAi führte zu einer Abnahme der *mdr1*-mRNA und folglich einer reduzierten Pgp-Expression (YAGUE et al. 2004). Der anschließende Einsatz des RNAi-Mechanismus *in vivo* scheiterte jedoch an der schnellen Verstoffwechselung der für die Wirkung entscheidenden siRNA (small interfering RNA)-Moleküle (MATSUI et al. 2005). Durch die Verpackung von siRNAs in polyethylenglycol-haltige, kationische Liposomen, so genannte „Stable Nucleic Acid Lipid Particles“ könnten diese Prozesse zukünftig verhindert und die zelluläre Aufnahme von siRNA verbessert werden (ZIMMERMANN et al. 2006). Im Einsatz von siRNA besteht jedoch die Gefahr der Beeinflussung der Interferon-Antwort von Säugern, der Aktivierung von Makrophagen und dendritische Zellen und von retrovirusvermittelten Insertionsmutagenesen durch die gentherapeutische Behandlung (KARIKO et al. 2004; LEUNG u. WHITTAKER 2005).

2.3.2 Die Modulation von Pgp durch Inhibition und endogene Substrate

Da Pgp auch an der Pharmakoresistenz von Krebs beteiligt ist, werden seit mehr als zwei Jahrzehnten Bemühungen unternommen, die Pgp-Funktion therapeutisch zu inhibieren (FOJO u. BATES 2003). In der Zellkultur zeigten zuerst verschiedene Substanzen eine Inhibition von Pgp, die eigentlich für andere Indikationsgebiete zugelassen waren. Dazu zählen Verapamil, Cyclosporin A und Quinidin, die bei pharmakoresistenten Krebspatienten zum Einsatz kamen. Aufgrund ihrer schwachen Bindungsaffinität zu Pgp wurden hohe Dosen dieser frühen Inhibitoren benötigt, was zu starken Nebenwirkungen führte (BATES et al. 2002). So benötigt Verapamil zur Inhibition von Pgp eine Plasmakonzentration von 2-6 μM . Diese Konzentration verursacht im Menschen allerdings schwere kardiovaskuläre Nebenwirkungen (FORD u. HAIT 1990). Die Pgp-Inhibitoren der zweiten Generation (Tabelle 2) sind Analoga der ersten Generation. Valspodar (PSC833) hat eine 10-20fach stärkere Affinität als Cyclosporin A und veranschaulicht die Entwicklung dieser Agentien. In der zur Pgp-Inhibition notwendigen Konzentration wird Valspodar zwar besser toleriert, doch inhibiert es auch das Cytochrom-P450 (CYP). Dies führt zu einer systemischen Zunahme von Stoffen, die über die Leber verstoffwechselt werden (FISCHER et al. 1998; WANDEL et al. 1999). Die damit einhergehende erhöhte Toxizität von Chemotherapeutika warf erste Zweifel hinsichtlich einer möglichen Therapie der Pharmakoresistenz von Krebs durch die selektive Pgp-Inhibition auf. (BOOTE et al. 1996).

Generation	Inhibitor
1. Generation	z.B. Verapamil, Nifedipin, Cyclosporin A, Quinidin, Amiodarone, Promethazin, Ketoconazol, Cephalosporine, Yohimbin, Propanolol
2. Generation	z.B. Valspodar, Elacridar, Biricodar
3. Generation	z.B. Tariquidar, Laniquidar, Zosuquidar, ONT-93

Tabelle 2: Die unterschiedlichen Generationen der Pgp-Inhibitoren. Verschiedene Ca^{2+} - Kanalblocker sind in der Lage Pgp zu inhibieren. Diese Inhibitoren wurden in der Vergangenheit beständig weiterentwickelt, weswegen derzeit drei Generationen von Pgp-Inhibitoren unterschieden werden, von denen die dritte gleichzeitig die Neueste ist.

Dennoch wurde weiterführend in die Entwicklung optimierter Pgp-Inhibitoren investiert. Basierend auf der Erforschung der Struktur und den Bindungsstellen von Pgp wurde eine 3. Generation von Pgp-Inhibitoren entwickelt, die sich durch eine höhere Spezifität und Wirkungspotenz auszeichnen. Dazu zählten Tariquidar (XR9576), Zosuquidar (LY335979), Laniquidar (R101933) und ONT-93 (THOMAS u. COLEY 2003). Tariquidar inhibiert die basale ATPase Aktivität von Pgp und BCRP. Verglichen mit den ersten beiden Generationen von Pgp-Hemmern ist Tariquidar der stärkste, selektivste und effektivste Modulator von Pgp. Es gibt Hinweise, dass die Transporterfunktion von BCRP ebenfalls durch Tariquidar gehemmt wird. Tariquidar hat eine lange Wirkungsdauer und weist eine sehr gute Bioverfügbarkeit auf (MARTIN et al. 1999; MISTRY et al. 2001). Bei der Kombination von Tariquidar mit verschiedenen Chemotherapeutika konnte die Pgp-vermittelte Pharmakoresistenz von Tumoren in Mausmodellen überwunden werden (MISTRY et al. 2001). Letztlich führte dies zu zwei Phase III Studien, in denen eine Kombination von Tariquidar mit den beiden Chemotherapeutika Vinorelbin oder Paclitaxel/Carboplatin bei Lungenkrebs zum Einsatz kam. Die systemische Hemmung von Pgp verursachte jedoch eine Toxizitätszunahme der Chemotherapeutika, so dass beide Studien eingestellt worden sind (FOX u. BATES 2007).

In Modellen pharmakoresistenter Epilepsie konnte durch die Anwendung von Tariquidar die Gehirngängigkeit des antikonvulsiv wirksamen Phenytoins verbessert werden (VAN VLIET et al. 2006). Außerdem kam es durch die Applikation von Tariquidar bei *pharmakoresistenten Tieren* in Kombination mit dem antikonvulsiv wirksamen Phenobarbital zu einer deutlichen Reduktion der Anfälle bis hin zur Anfallsfreiheit (BRANDT et al. 2006). Es ist davon auszugehen, dass die Inhibition von Pgp im Gehirn jedoch zu einer gesteigerten Penetration von Fremdstoffen und körpereigenen Pgp-Substraten führt. Dazu würden zum Beispiel verschiedene Hormone und Bilirubin zählen, die letztendlich neurotoxische Effekte vermitteln können. Für die ZNS-Therapie wäre es daher ein großer Vorteil, wenn die Transportfunktion von Pgp über einen sehr kurzen Zeitraum durch endogene Substrate beeinflusst werden könnte. Dadurch könnte in einem schmalen Zeitfenster die Blut-Hirn-Schranke für Therapeutika geöffnet werden, langfristig jedoch die Schutzfunktion aufrecht erhalten bleiben (BAUER et al. 2007).

In verschiedenen Geweben konnten regulatorische Mechanismen beschrieben werden, die Pgp anscheinend schnell und unmittelbar beeinflussen. So kommt es durch die Freisetzung des Entzündungsauslösers Lipopolysaccharid (LPS) auch zu einer Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Faktoren wie Interleukine und TNF- α (TU u. BAZAN 2003). TNF- α führt zu einem schnellen und reversiblen Verlust der Pgp-Funktion, was mit Hilfe des fluoreszierenden Cyclosporin-A Derivats (NBD-CSA) anschaulich dargestellt werden kann. Über den TNF-Rezeptor 1 scheint TNF- α Endothelin-1 (ET-1) freizusetzen. Auch ET-1 induziert an isolierten Rattenkapillaren einen fast vollständigen Funktionsverlust von Pgp, was über den ET_B Rezeptor geschieht. Dieser setzt Stickstoffoxid-Synthase (NOS) frei, die durch Protein-Kinase-C (PKC) die Pgp-Transportaktivität reduziert. Die reduzierte Pgp-Funktion ist somit die frühe Konsequenz einer milden Entzündung (HARTZ et al. 2004, 2006). Doch zeigte sich in diesen kurzzeitigen Experimenten kein Einfluss auf die Pgp-Expression (HARTZ et al. 2006). Die Expression von Pgp als Antwort auf die Auseinandersetzung mit diesen Substanzen scheint vielmehr in einem komplexen, zeitabhängigen Zusammenhang zu stehen. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass ein Signalweg vorhanden sein muss, indem chronische Entzündungsprozesse zu einer verstärkten Expression und Aktivität von Pgp führen können (BAUER et al. 2007).

2.3.3 Die Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Expression

Die Vorarbeit der Kooperationsgemeinschaft

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Björn Bauer von der University of Minnesota (USA) und der Arbeitsgruppe von David Miller vom National Laboratory of Pharmacology and Chemistry, NIH/NIEHS, NC (USA) konnte die Arbeitsgruppe von Heidrun Potschka einen Glutamat/ N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor/COX-2 Weg identifizieren der zu einer zunehmenden Expression und Transport-Aktivität von Pgp führt (BAUER et al. 2008). Die Kooperationsgemeinschaft konnte zeigen, dass die Inkubation von frisch isolierten Gehirnendothelzellen mit Glutamat und die Mikroinjektionen von Glutamat in den rechten Hippocampus die Zunahme der Pgp-Expression induziert. Diese Zunahme der Pgp-Expression vermittelt Glutamat durch die Stimulation des NMDA-Rezeptors. MK801, ein selektiver Hemmstoff des NMDA-Rezeptors kann folglich die Glutamat induzierte Pgp-Expression in vitro verhindern. Nachdem es in der Niere bereits Hinweise auf eine Beteiligung der

Cyclooxygenase-2 (COX-2) an der Pgp-Expression gegeben hatte (PATEL et al. 2002), konnte dies nun erstmalig in Gehirndothelzellen belegt werden. Dabei ist an isolierten Gehirndothelzellen erstmals eine physiologische COX-2-Expression nachgewiesen worden. Durch die Inkubation mit Glutamat kam es zu einer Aktivitätszunahme der COX-2, die anhand des Syntheseproduktes Prostaglandin-E₂ (PGE₂) dargestellt werden konnte. Aus der PGE₂-Synthese resultierte auch eine Zunahme der Pgp-Expression in vitro. Dabei war an isolierten Gehirndothelzellen lediglich eine Zunahme der COX-2-Aktivität, jedoch keine Zunahme der COX-2-Expression nachweisbar. Es gelang außerdem die Kollokalisierung von Pgp und COX-2 immunhistologisch zu belegen. Die selektive COX-2-Hemmung kann demzufolge die Pgp-Expression in vitro und wahrscheinlich daher auch die daraus resultierende Pharmakoresistenz in vivo beeinflussen. Nachdem es in vitro gelungen ist, durch die selektive COX-2-Hemmung die glutamatinduzierte Pgp-Überexpression zu verhindern, verfolgt die vorliegende Arbeit in der Konsequenz das Ziel, diese Ergebnisse in vivo zu verifizieren.

Der Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2 Weg führt zur Pgp-Überexpression

Glutamat ist prinzipiell ein erregender Neurotransmitter des ZNS von Säugetieren, der außerdem die Expression von Pgp beeinflussen kann (COYLE 1993; CHOI 1998; ZHU u. LIU 2004; BANKSTAHL et al. 2008; BAUER et al. 2008). Die Pgp-Expression steht dabei in Abhängigkeit zur extrazellulären Glutamatkonzentration, weswegen isolierte Gehirndothelzellen in vivo eine wesentlich höhere Pgp-Expression zeigen als in vitro (BARRAND et al. 1995; SEETHARAMAN et al. 1998; ZHU u. LIU 2004; BAUER et al. 2008). Im Anfallsgeschehen kommt es zu einer massiven Freisetzung und Akkumulation von Glutamat in der interstitiellen Flüssigkeit (STRAUSS u. MARINI 2002). Glutamat vermittelt durch die Stimulation des NMDA-Rezeptors die Erhöhung der Pgp-Expression und Aktivität (ZHU u. LIU 2004; BAUER et al. 2008). Die Erhöhung der Pgp-Expression kann durch die Inhibition des NMDA-Rezeptors mittels MK-801 folglich beeinflusst werden (BAUER et al. 2008). Die reversible Bindung von Glutamat an die NMDA-Rezeptoren bewirkt einen schnellen Einstrom von Ca⁺ in die Zelle. Dies führt zur Calcium-Überladung der Mitochondrien und zur Freisetzung von intrazellulären Sauerstoffradikalen (MAWATARI et al. 1996; VERGUN et al. 2001; HOLMES 2002; MATUTE et al. 2002). Der daraus resultierende oxidative Stress induziert letztlich eine Zunahme der Pgp-Expression

(FELIX u. BARRAND 2002). An kultivierten Gehirndothelzellen kann der Radikalfänger N-Acetylcystein daher sowohl die Generierung der Sauerstoffradikale als auch die Glutamat induzierte Pgp-Expression und Aktivität abschwächen (ZHU u. LIU 2004). Neben verschiedenen Formen von Zellschäden, bewirken Sauerstoffradikale wahrscheinlich eine Stimulation der Phospholipase- A_2 (PLA $_2$) an der Zellmembran. Durch die Aktivität der PLA $_2$ wird aus Membranphospholipiden Arachidonsäure abgespalten (PEPICELLI et al. 2005). Arachidonsäure ist das Substrat von Cyclooxygenasen (COX), die daraus Prostaglandine synthetisieren. Das Anfallsgeschehen induziert demzufolge eine erhöhte Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden, wodurch der COX vermehrt Substrat zur Verfügung steht. In Folge der Akkumulation der Arachidonsäure kommt es daher vermutlich zu einer Zunahme der COX-Aktivität. Dabei führt die gesteigerte Aktivität der COX-2 an kultivierten Endothelzellen zu einer erhöhten Pgp-Expression (BAUER et al. 2008).

Die COX-2 wird im Laufe inflammatorischer Prozesse durch verschiedene Mitogene induziert und kommt nur in wenigen Geweben wie dem zentralen Nervensystem (ZNS) physiologisch vor (O'BANION et al. 1992; BREDER et al. 1995). Dort ist sie im Cortex und allocorticalen Strukturen wie Hippocampus und Amygdala lokalisiert (BREDER et al. 1995). Die COX-2 hat im Gehirn einen Einfluss auf die Regulation der zerebralen Mikrozirkulation und der synaptischen Funktionen (VAUGHAN 1998) sowie der neuronalen Übererregbarkeit (WILLINGALE et al. 1997) und des neuronalen Zelltodes (WALTON et al. 1997; NAKAYAMA et al. 1998). Diese Einflüsse werden überwiegend durch Prostaglandine vermittelt. Prostaglandine sind parakrine und autokrine Mediatoren, die ein breites Spektrum an Funktionen beeinflussen (Abbildung 2.7) (MASFERRER et al. 1990; XIE et al. 1991; MITCHELL et al. 1995).

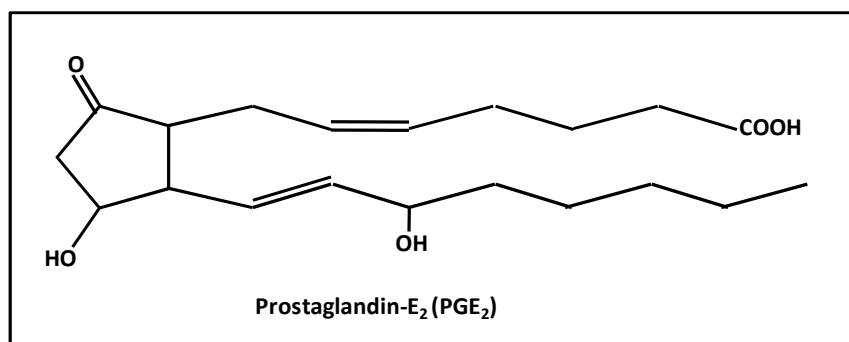


Abbildung 2.5 PGE $_2$ Bei PGE $_2$ handelt es sich um das neurotoxische Syntheseprodukt der COX-2, die PGE $_2$ aus Arachidonsäure synthetisiert.

Zu einer Zunahme der COX-2-Expression kommt es in neuronalen Zellen durch verschiedene neuropathologische Erkrankungen (STRAUSS u. MARINI 2002). Dazu zählen traumatische Gehirnschäden (DASH et al. 2000; STRAUSS et al. 2000), zerebrale Ischämie (COLLACO-MORAES et al. 1996; NOGAWA et al. 1997), eine ausgeprägte Depression (CAGGIANO et al. 1996), Alzheimer (PASINETTI u. AISEN 1998) und Epilepsie (DESJARDINS et al. 2003). NMDA-Rezeptor-vermittelt führen chemisch und elektrisch induzierte Anfälle zu einer transkriptionellen Aktivierung des COX-2-Gens und folglich zur Zunahme der COX-2-Expression, die 18-24 h nach dem Anfallsgeschehen in neuronalen Zellen nachweisbar ist (TU u. BAZAN 2003; VOUTSINOS-PORCHE et al. 2004; KAWAGUCHI et al. 2005; TAKEMIYA et al. 2006; LEE et al. 2007). Daraus folgt nach einem Anfallsgeschehen auch eine verstärkte Synthese des neurotoxischen Prostaglandin-E₂ (PGE₂) (KAWAGUCHI et al. 2005; TAKEMIYA et al. 2006). Die selektive COX-2-Hemmung reduziert die Bildung von PGE₂, woraus eine neuroprotektive Wirkung selektiver COX-2-Hemmstoffe resultiert (HARA et al. 1998; NAKAYAMA et al. 1998; BAIK et al. 1999; MIRJANY et al. 2002; GOBBO u. O'MARA 2004; KAWAGUCHI et al. 2005).

In kultivierten Gehirndothelzellen der Blut-Hirn-Schranke konnte jedoch keine Veränderung der COX-2-Expression festgestellt werden. Durch die Glutamat induzierte Aktivierung des NMDA-Rezeptors kommt es zu einer massiven Freisetzung von Arachidonsäure. Aufgrund des Vorhandenseins des Ausgangssubstrates wird die verstärkte COX-2-Aktivität induziert. Die Aktivitätszunahme der COX-2 führt zu einer Zunahme der PGE₂-Synthese. PGE₂ vermittelt wahrscheinlich über den EP-1-Rezeptor die Induktion des Transkriptionsfaktors NF-κB, der möglicherweise die Expression von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke vermittelt (Abbildung 2.6). Die Hemmung des NMDA-Rezeptors und die selektive Hemmung der COX-2 verhindern folglich im Gegensatz zur selektiven COX-1-Hemmung die Pgp-Expression in vitro (BAUER et al. 2008).

Daher soll nun mittels selektiver COX-2-Hemmung in vivo eine praktikable Strategie zur Inhibition oder Prävention der anfallsinduzierten Pharmakoresistenz und der damit assoziierten Pharmakoresistenz identifiziert werden. Mittels der selektiven COX-2-Hemmstoffe Celecoxib und NS-398 wird im fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell versucht, die anfallsinduzierte Pgp-Expression in vivo zu verhindern. Dabei

soll außerdem gezeigt werden, dass die anfallsinduzierte Bildung des neurotoxischen PGE_2 durch die selektive COX-2-Inhibition in vivo zu verhindern ist.

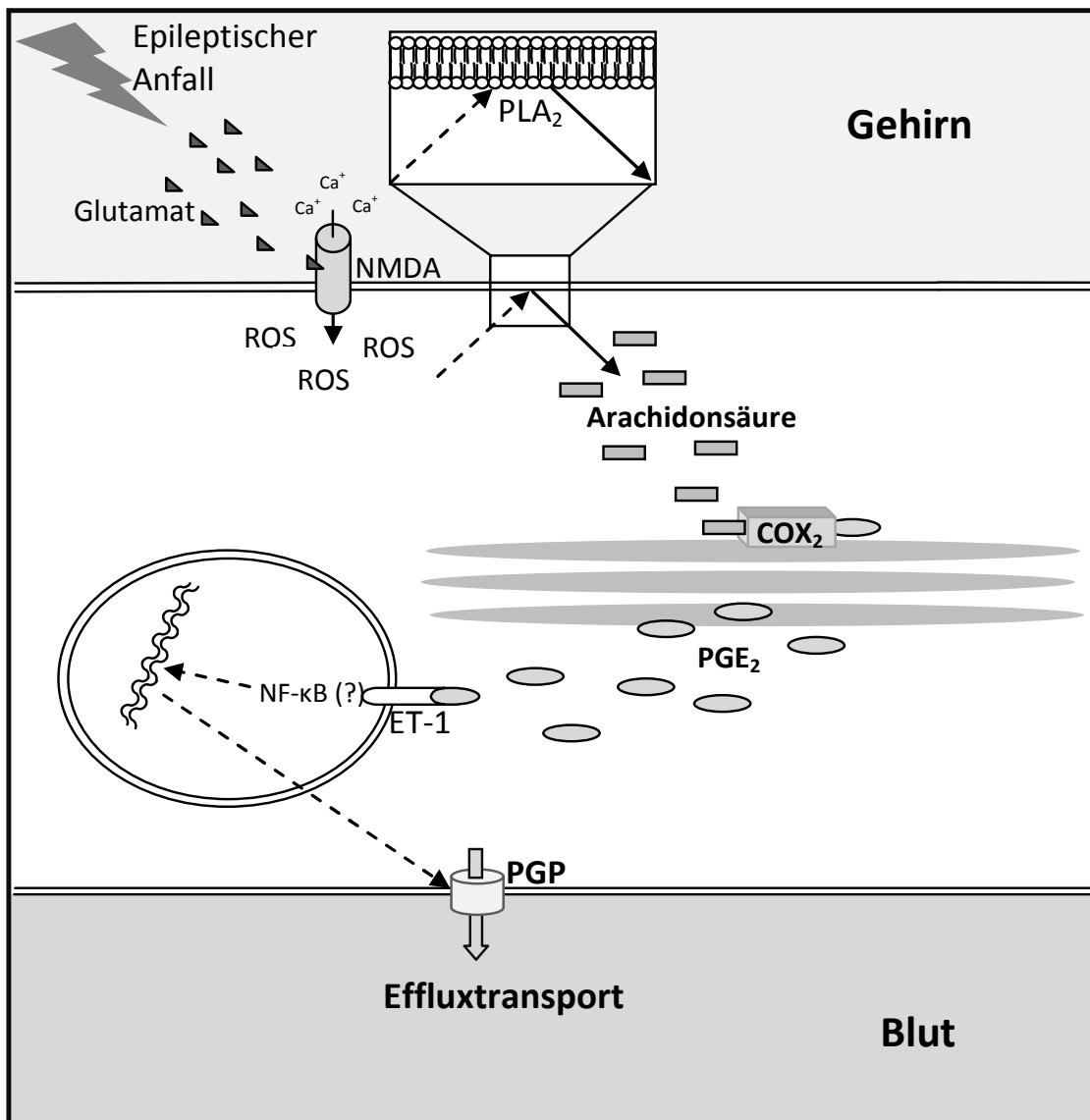


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung der Pgp-Expression in einer Endothelzelle.

Induziert durch einen epileptischen Anfall kommt es zur Glutamatfreisetzung und über den NMDA-Rezeptor zur Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS). Durch die Phospholipase-A₂ (PLA₂) wird aus der Lipiddoppelschicht Arachidonsäure freigesetzt. Die Freisetzung der Arachidonsäure führt zu einer verstärkten Aktivität der COX-2 und somit zur Bildung von PGE_2 , welches über den EP-1 Rezeptor die Pgp-Expression induziert.

Cyclooxygenase-2 (COX-2) – Möglichkeiten der selektiven Hemmung

Die medizinischen Eigenschaften der Salicylate wurden zwar bereits 1763 erstmalig beschrieben, doch konnte Vane erst 1971 die analgetische Wirkung der Nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) auf die Hemmung der Prostaglandinsynthese zurückführen (VANE 1971). Die Prostaglandinsynthese geschieht durch Cyclooxygenasen (COX), die dazu in einem ersten Schritt aus Arachidonsäure Prostaglandin- G_2 katalysieren und dieses dann in einem zweiten Schritt in Prostaglandin- H_2 synthetisieren (Abbildung 2.7). PGH_2 stellt wiederum die Grundlage für zahlreiche gewebespezifische Prostaglandin-Synthasen dar (HINZ u. BRUNE 2002; FITZGERALD 2004). In den frühen 90ern konnte nachgewiesen werden, dass die COX in zwei Isoformen existiert (XIE et al. 1991). Simmons et al. konnten Ende der 90er noch eine dritte Isoform isolieren, die im Gehirn an der Vermittlung des Schmerzes beteiligt ist (SIMMONS et al. 1999). Da es sich bei der COX-3 um eine sehr eng verwandte Form der COX-1 handelt, die im cerebralen Cortex und im Herzen ca. 5% der COX-1 Konzentration ausmacht, wird sie im Folgenden nicht mehr von der COX-1 differenziert (BAZAN u. FLOWER 2002).

Die COX-1 wird in nahezu allen Geweben exprimiert und vermittelt überwiegend physiologische Reaktionen, wie zum Beispiel die Zytoprotektion des Magens und die Blutplättchenaggregation. Die Nebeneffekte der NSAIDs, wie gastrointestinale Ulzerationen und Gerinnungsstörungen wurden daher als Folge der COX-1-Hemmung beschrieben. Auch wenn die COX-2 in einigen Geweben physiologisch vorkommt, wird sie vorwiegend von Entzündungszellen wie Makrophagen und Monozyten exprimiert. Dadurch ist die COX-2 überwiegend in pathologische Prozesse, wie der akuten und chronischen Entzündung involviert (Abbildung 2.7) (HINZ u. BRUNE 2002; HINZ et al. 2007). Allerdings vermittelt die COX-2 durch ihre physiologische Lokalisation in Gefäßendothelien auch vasoprotektive und antiatherogene Effekte. Diese Effekte werden über das Syntheseprodukt Prostacyclin vermittelt. Prostacyclin ist ein starker Hemmer der Blutplättchenaggregation, der Leukozyten-Aktivierung und -Adhäsion und der Akkumulation von Cholesterol in Gefäßendothelien (HINZ et al. 2007). Daraus resultiert ein erheblicher kreislaufregulatorischer Einfluss der COX-2. Diese Mechanismen waren allerdings lange Zeit unbekannt, weswegen man sich in der Vergangenheit intensiv mit einer selektiven COX-2-Hemmung auseinandersetzte. Durch die selektive Hemmung der

COX-2 erhoffte man sich die gleichen therapeutischen Effekte der NSAIDs, nicht aber deren Nebenwirkungen, was die pharmazeutische Industrie zur Entwicklung der selektiven COX-2-Hemmstoffe motivierte (FITZGERALD u. PATRONO 2001; HINZ u. BRUNE 2002; FLOWER 2003). Selektive COX-2-Hemmstoffe sollen somit bei therapeutischer Dosierung keine klinisch relevante COX-1-Hemmung zeigen (HINZ et al. 2007).

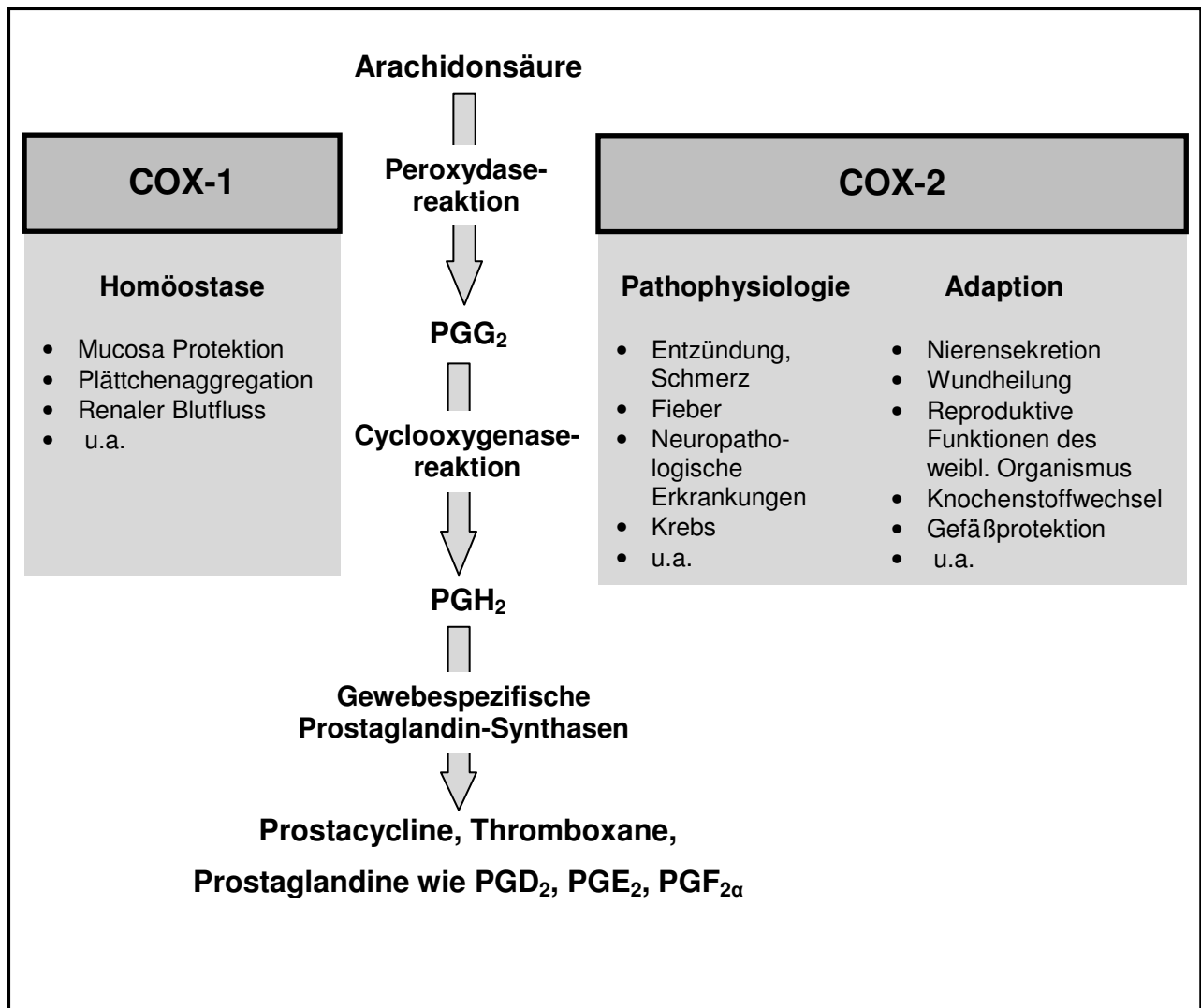


Abbildung 2.7 Die Prostaglandinsynthese. Gezeigt wird die bifunktionale Rolle des COX-Enzyms (Prostaglandin G/H Synthase) in der Biosynthese von Prostaglandinen (PGG₂, PGH₂, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), sowie pathologische und physiologische Effekte der COX-1 und COX-2-Aktivität (Modifiziert nach HINZ u. BRUNE, 2002).

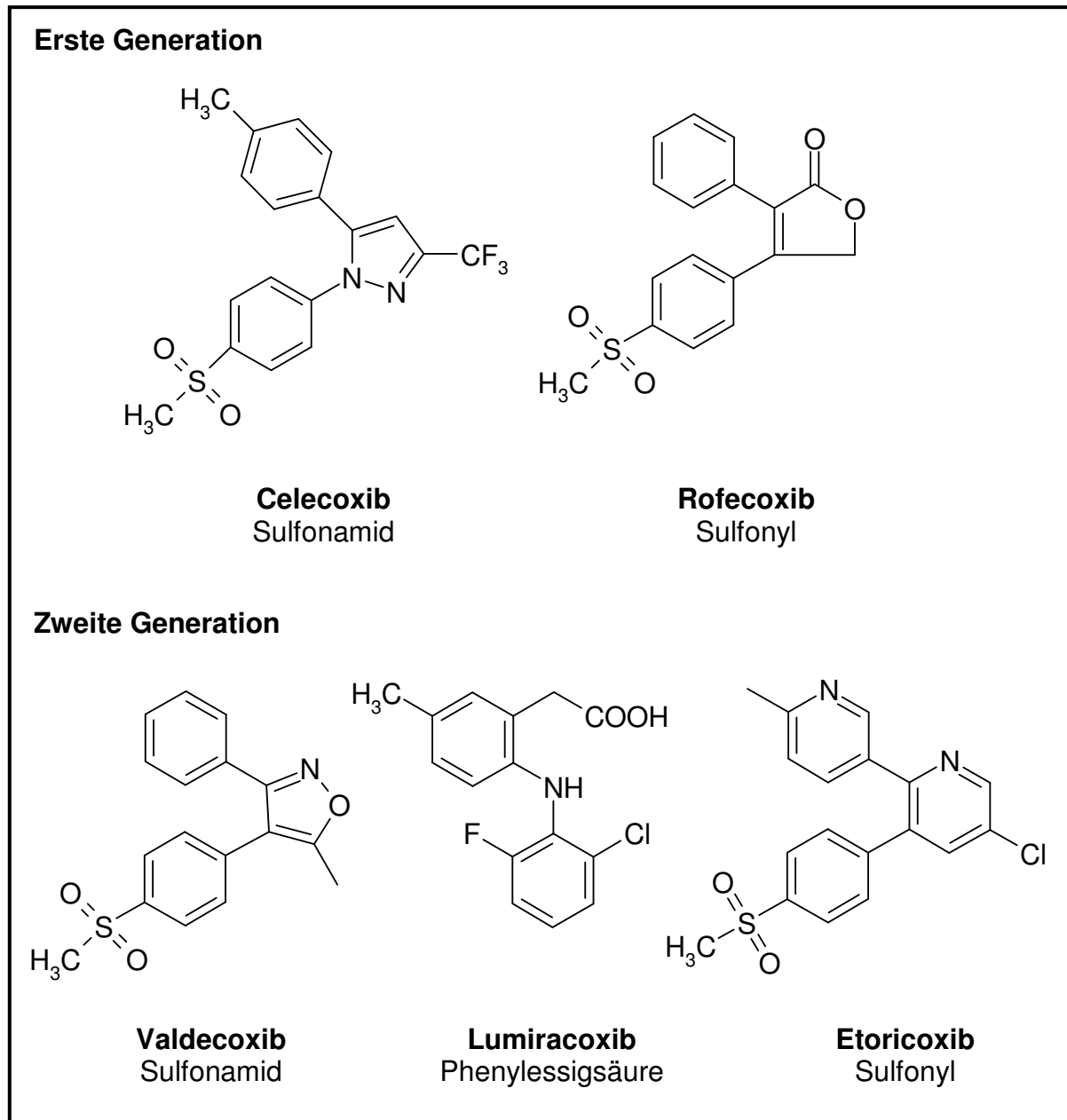


Abbildung 2.8 Molekulare Struktur der Coxibe der ersten und zweiten Generation. Angegeben sind Name und der Typ der Struktur verschiedener Coxibe. (Modifiziert nach TOPOL u. FALK 2004).

Die Basis zur Entwicklung COX-2 selektiver Substanzen lieferte Mitte der neunziger Jahre die röntgenkristallographische Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von COX-1 und COX-2. Die beiden Isoformen haben eine sehr ähnliche Struktur und bestehen prinzipiell aus einer N-terminalen Domäne, einem Membran bindenden Teil und der C-terminalen katalytischen Domäne, die die COX und die Peroxydase Aktivität enthält. NSAIDs wirken nun auf unterschiedliche Weise. Aspirin hemmt durch Acetylierung der aktiven Seite irreversibel die Bindungsstelle der Arachidonsäure, wohingegen Ibuprofen einen kompetitiven Antagonisten der

Arachidonsäure darstellt. Eine dritte Klasse der NSAIDs, zu der Indomethacin gehört, verursacht eine langsame reversible Induktion der COX, die auf eine vorübergehenden Konformationsänderung beruht (HINZ u. BRUNE 2002).

Der Unterschied von COX-1 und COX-2 beruht lediglich auf einer Aminosäure in Position 523 des hydrophoben Kanals der C-terminalen Domäne (Isoleuzin in COX-1 und Valin in COX-2). Durch das kleinere Valinmolekül entsteht eine Seitentasche, die als Bindungsstelle der COX-2-selektiven Substanzen angenommen wird. Dadurch ist die Bindungsstelle der NSAIDs 17% größer bei COX-2, wodurch größere Inhibitoren einfacher gebunden werden können, als an der COX-1 (LUONG et al. 1996). Dieser Unterschied ermöglichte die Entwicklung von Coxiben, als selektive Inhibitoren der COX-2 (Abbildung 2.8) (KURUMBAIL et al. 1996; TOPOL u. FALK 2004). Celecoxib und Rofecoxib waren die beiden ersten erhältlichen COX-2-Hemmstoffe. Basierend auf diesen ersten Coxiben wurde eine zweite Generation entwickelt, deren COX-2-Selektivität gegenüber der ersten Generation verbessert war (Abbildung 2.8) (TOPOL u. FALK 2004).

Celecoxib wurde im Dezember 1998 von der US Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung der Osteoarthritis zugelassen. Mit seiner 4-Methylsulfonylphenyl-Gruppe interagiert es mit der spezifischen Bindungsstelle des COX-2-Enzyms und verursacht dadurch eine langsame zeitabhängige, irreversible Hemmung der COX-2 (HINZ u. BRUNE 2002). Celecoxib verteilt sich homogen im Körper, durchläuft eine erhebliche first-pass Verstoffwechselung über Cytochrom P450 (22-40% orale Bioverfügbarkeit) und seine Eliminationshalbwertszeit ist sehr variabel ($t_{1/2}$ = ca. 6-12h) (WERNER et al. 2002; HINZ et al. 2007). Celecoxib ist eine effektive, antiinflammatorische und analgetische Substanz, die bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis zum Einsatz kommt. Aufgrund seiner zeitabhängigen Wirkung eignet es sich jedoch schlecht zur Behandlung des akuten Schmerzes, weswegen NSAIDs auch weiterhin eine wichtige Rolle in der Schmerztherapie spielen werden (HINZ et al. 2007). Neben den bereits aufgezeigten neuroprotektiven Effekten, mindert Celecoxib Hirnhautentzündungen und Gehirnödeme nach Hirnblutungen, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass es aufgrund seiner sehr hohen Lipophilie leicht die Blut-Hirn-Schranke überwindet (CHU et al. 2004).

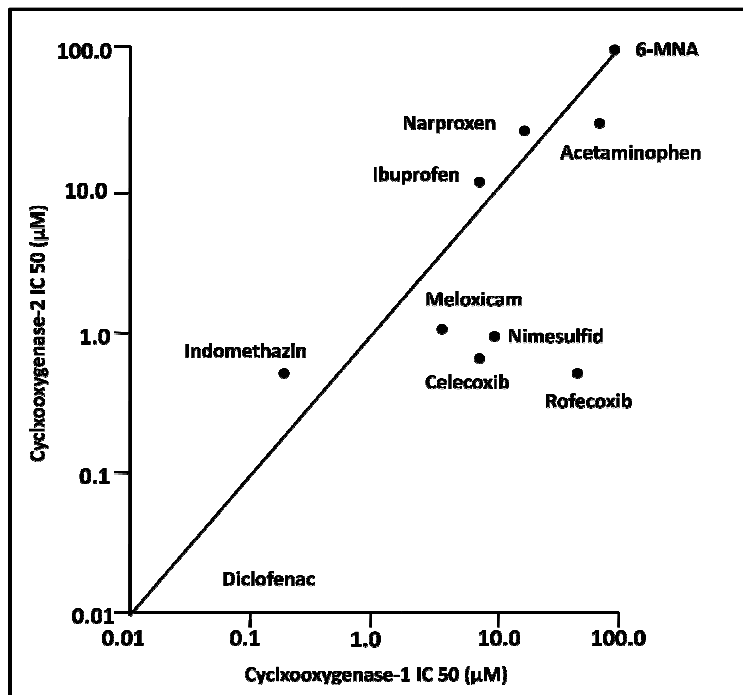


Abbildung 2.9 COX-Spezifität

Aufgetragen sind die benötigten Konzentrationen verschiedener Medikamente zur Reduktion der Aktivität der Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 um 50 Prozent (IC₅₀) in Gesamtblutproben. (Modifiziert nach FITZGERALD u. PATRONO 2001)

Celecoxib verursacht allerdings auch eine Reihe von Nebenwirkungen, die in der sogenannte CLASS-Studie (Celecoxib Long Term Arthritis Safety Study) getestet worden sind. Da die Hemmung der Prostacyclin-Synthese verschiedene kardiovaskuläre Effekte vermittelt, geht man davon aus, dass durch die Therapie mit Celecoxib das Herzkreislaufrisiko mit der Dosis und der Behandlungsdauer ansteigen kann (FITZGERALD 2004). Die erhöhte Inzidenz von Myokardinfarkten führte zur Zurücknahme der meisten stark selektiven COX-2-Hemmstoffe. Deswegen ist Celecoxib derzeit als einziger COX-2-Hemmstoff in den USA und der EU zugelassen. Zur Behandlung des postoperativen Schmerzes wird in der EU allerdings noch Parecoxib vertrieben (HINZ et al. 2007).

NS-398 (N-[2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl]methanesulfonamid) ist ein NSAID mit analgetischen und antipyretischen Effekten. Seine antiinflammatorischen und analgetischen Effekte entsprechen der Wirkung von Indomethacin, wobei NS-398 wesentlich weniger gastrointestinale Läsionen verursacht (FUTAKI et al. 1994). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass NS-398 nur in höheren Dosen (27 mg/kg) eine analgetische Wirkung zeigt, wobei bei dieser Dosierung eine zusätzliche Inhibition der COX-1 nicht ausgeschlossen werden kann (EUCHENHOFER et al. 1998). Die antiinflammatorische Wirkung von NS-398 ist je nach Indikation jedoch stärker als Diclofenac und Loxoprofen (FUTAKI et al. 1993). Durch NS-398 gelang es die

neuronale Toxizität zu mindern (HEWETT et al. 2000) und die Synthese von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Gehirn zu reduzieren (HARA et al. 1998; TEGEDER et al. 2000; TAKEMIYA et al. 2006). Diese und andere Studien weisen dadurch nach, dass der selektive COX-2-Hemmstoff NS-398 in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

3 Zielsetzung und Arbeitshypothese

Epilepsie ist die häufigste chronische, neurologische Erkrankung bei Mensch und Tier. Die häufig lebenslange Pharmakotherapie mit antikonvulsiven Wirkstoffen stellt neben der chirurgischen Entfernung des epileptischen Fokus derzeit die wichtigste Möglichkeit zur Behandlung der Epilepsie dar. Nahezu einem Drittel aller Epilepsiepatienten kann durch den Einsatz von antikonvulsiven Wirkstoffen allerdings nicht ausreichend geholfen werden. Diese Patienten gelten als pharmakoresistent (REGESTA u. TANGANELLI 1999).

Bei der Pharmakoresistenz handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. Im Rahmen der Multi-Drug-Transporter-Hypothese wird das Ausbleiben des Behandlungserfolges pharmakoresistenter Epilepsien maßgeblich der Überexpression des Multidrug-Transporters P-Glycoprotein (Pgp) zugeschrieben. Pgp befindet sich unter anderem an der luminalen Membran von Gehirndothelzellen und kann unter Energieverbrauch verschiedene Fremdstoffe wie Antiepileptika in das Blut zurückpumpen, bevor diese das Gehirnparenchym erreichen. Dadurch handelt es sich bei Pgp generell um einen sehr wichtigen Schutzmechanismus der Blut-Hirn-Schranke. Die selektive Inhibition von Pgp führt somit zu weitreichenden neurotoxischen Effekten und ist klinisch derzeit nicht praktikabel. Durch die weitere Aufklärung der Mechanismen, die zur Überexpression von Pgp führen, könnten sich therapeutische Zielstrukturen ergeben der Pgp-basierten Pharmakoresistenz zu begegnen (BAUER et al. 2005).

Die Pgp-Expression wird durch glutamerge Mechanismen gesteuert (BAUER et al. 2008). Durch die exzessive Freisetzung von Glutamat kommt es im Anfallsgeschehen an der Blut-Hirn-Schranke zur Stimulation von NMDA-Rezeptoren, die durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen die Phospholipase-A₂ (PLA₂) aktivieren. Die Aktivität der PLA₂ verursacht die Liberalisierung von Arachidonsäure, die von der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in PGE₂ synthetisiert wird.

Durch die selektive COX-2-Hemmung wurde in vitro bereits eine mögliche therapeutische Zielstruktur identifiziert, die Glutamat induzierte Pgp-Überexpression zu verhindern (BAUER et al. 2008). Die Prävention der Pgp-Überexpression durch die selektive COX-2-Hemmung soll nun in vivo weiterführend untersucht werden.

Aus diesem Ziel ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Lässt sich die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression mittels Celecoxib in einem Status epilepticus (SE)-Modell verhindern?
- Wie stark ist der Einfluss des Anfallsgeschehens auf die hippocampale COX-2-Aktivität?
- Hat NS-398 einen Einfluss auf die COX-2-Aktivität im Gehirn und lässt sich die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression mittels NS-398 in einem SE-Modell verhindern?

In der Vergangenheit konnte in verschiedenen Tiermodellen die Überexpression von Pgp durch die elektrische oder chemische Auslösung eines Status epilepticus (SE) induziert werden. Zur Klärung der Fragestellungen soll das fraktionierte Lithium-Pilocarpin-Modell zum Einsatz kommen. Durch die gleichzeitige selektive COX-2-Hemmung mit Celecoxib oder NS-398 soll in vivo eine praktikable Strategie zur Inhibition der Pgp Überexpression identifiziert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Formulierung der applizierten COX-2-Hemmstoffe

4.1.1 Erstellen einer Celecoxib-Suspension

Für die Versuche mit den selektiven COX-2-Hemmstoffen Celecoxib und NS-398 wurde die Löslichkeit der Substanzen in unterschiedlichen Medien getestet. Zwar finden sich in der Literatur bezüglich des Löslichkeitsverhaltens von Celecoxib zahlreiche Hinweise, von denen Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 einen Auszug zeigen, doch war es nicht möglich für die in vivo Versuche eine geeignete Vehikellösung zu finden, in der sich die benötigte Menge Substanz löste. Daher wurde eine homogene Suspension hergestellt.

Aufgrund der schwach sauren Amid-Gruppe ist Celecoxib mit seinem p_Ka-Wert von 11 im physiologischen pH nahezu unlöslich (VENTURA 2005). Zur Erstellung einer stabilen Celecoxib-Suspension wurden daher 200 mg Celecoxib (Celebrex[®] Pfizer, Karlsruhe) unter Rühren auf dem Magnetrührer in 3 ml Dimethylsulfoxid gelöst und mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung (Braun, Melsungen) auf 30 ml aufgefüllt (GOBBO u. O'MARA 2004). Dabei entsteht eine stabile milchig-weiße Suspension. Die Dosierung betrug 20 mg/kg Celecoxib in 3 ml 10%iger DMSO Lösung (pH=8) zweimal täglich.

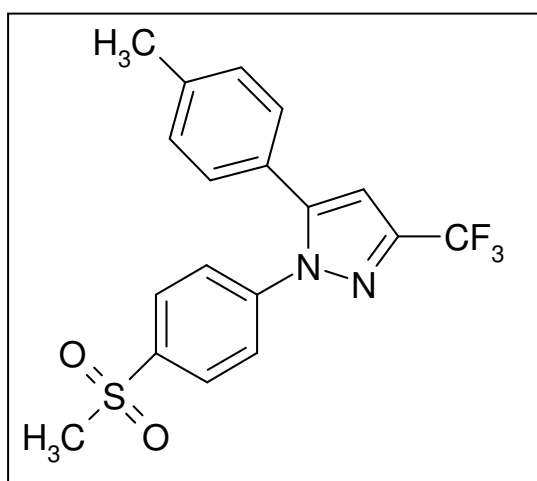


Abbildung 4.1 Chemische Struktur von Celecoxib

Lösungsmittel	Konzentration	Temperatur	pH	Löslichkeit
Cornoil	100%	Raumtemperatur	9	unlöslich
Cornoil	100%	50 °C	9	unlöslich
Dimethylsulfoxid	100%	Raumtemperatur	8	löslich
Dimethylsulfoxid	50%	Raumtemperatur	<12	unlöslich
Dimethylsulfoxid	50%	Raumtemperatur	12	löslich
Dimethylsulfoxid	50%	50 °C	<12	unlöslich
Dimethylsulfoxid	30%	Raumtemperatur	<12	unlöslich
Dimethylsulfoxid	30%	50 °C	<12	unlöslich
Ethanol	100%	Raumtemperatur	6	löslich
Ethanol	40%	Raumtemperatur	6	Instabil
Ethanol	30%	Raumtemperatur	<14	unlöslich
Ethanol	30%	50 °C	<14	unlöslich
NaCl-Lsg. (isoton)	0,9%	Raumtemperatur	14	löslich
NaCl-Lsg. (isoton)	0,9%	Raumtemperatur	<14	unlöslich
NaCl-Lsg. (isoton)	0,9%	50 °C	<14	unlöslich

Tabelle 4.1: Löslichkeitsverhalten von Celecoxib. Das Löslichkeitsverhalten von Celecoxib in Ethanol und Dimethylsulfoxid bei verschiedenen Konzentrationen und in isotoner NaCl-Lsg und Cornoil. pH Werte von <12 oder <14 wurden durch Titration unter Rühren erreicht.

Lösungsmittel	Konzentration	Temperatur	pH	Löslichkeit
Dimethylsulfoxid	10%	Raumtemperatur	8	Stabile Suspension
NaCl-Lsg (isoton)	0,9%	Raumtemperatur	7	unlöslich

Tabelle 4.2: Löslichkeitsverhalten von Celebrex®. Das Löslichkeitsverhalten von Celebrex® in 10% Dimethylsulfoxid-Lsg und isotoner NaCl-Lsg

4.1.2 Erstellen einer NS-398 Suspension

Auch hinsichtlich NS-398 finden sich in der Literatur einige Hinweise zum Löslichkeitsverhalten, von denen einige in Tabelle 4.3 zusammengefasst sind.

Zur Erstellung einer stabilen NS-398 Suspension wurde 0,6 ml/kg Cremophor EL (Sigma, Taufkirchen) in einem Schnappdeckelgläschen auf dem Magnetrührer auf 35°C erhitzt, mit 10 mg/kg NS-398 (Cayman Chemical, Michigan, USA) versehen und mit Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen) auf 3 ml/kg aufgefüllt. Die schwache Erhitzung auf 35°C verbesserte das Injektionsverhalten, nicht jedoch das Löslichkeitsverhalten der Cremophor EL Lösung. Die Dosierung betrug 10 mg/kg NS-398 in 20%iger Cremophor EL Lösung (pH=6).

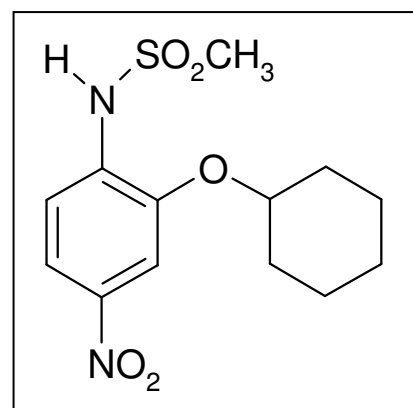


Abbildung 4.2 Chemische Struktur von NS-398

Lösungsmittel	Konzentration	Temperatur	pH	Löslichkeit
Cornoil	100%	Raumtemperatur	9	unlöslich
Cornoil	100%	<50 °C	9	unlöslich
Cremophor EL	20%	Raumtemperatur	6	Stabile Suspension
NaCl-Lsg (isoton)	0,9%	<50 °C	7	Unlöslich
Polyethylenglycol 400	100%	Raumtemperatur	7	Unlöslich

Tabelle 4.3: Löslichkeitsverhalten von NS-398. Das Löslichkeitsverhalten von NS-398 wurde in verschiedenen Lösungsmitteln, unterschiedlicher Konzentration, Temperatur und pH getestet.

4.2 Fraktioniertes Lithium-Pilocarpin-Modell

4.2.1 Versuchstiere

Für alle Versuche wurden weibliche Ratten des Auszuchtstammes Wistar-Unilever (Harlan-Winkelmann, Borcheln) mit einem Durchschnittsgewicht von 214 g (185 g-249 g) und einem Alter von ca. 10 Wochen verwendet. Nach der Ankunft wurden die Ratten zu maximal fünf Tieren in Makrolonkäfigen (Typ IV) unter kontrollierten Bedingungen bei einer Temperatur von 22-24°C, 50-60% Luftfeuchtigkeit und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel Zyklus (7.00 -19.00 Uhr MEZ) gehalten. Die Wasser- und Futterzufuhr erfolgte ad libitum, wobei das Wasser zwei- und das Futter einmal wöchentlich ausgetauscht wurde. Als Trinkwasser kam Leitungswasser und als Futter Labornagerfutter (Höveler, Dormagen) zum Einsatz. Als Einstreu wurde Weichholzgranulat (Equi Power Allround Späne; Vetripharm, Kaufering) verwendet. Die Tiere wurden wöchentlich und mindestens zwei Tage vor Versuchsbeginn in neue Käfige umgesetzt, um eine Beunruhigung der Ratten unmittelbar vor dem Experiment zu vermeiden.

Nach der Ankunft hatten die Tiere mehrere Tage Zeit sich zu akklimatisieren. Vier Tage vor Versuchsbeginn wurde mit dem Handling (Wiegen, Injektionen) begonnen. Dadurch wurden die Tiere an das Versuchsprozedere gewöhnt. Im Verlauf des Versuchs wurden die Tiere zur exakten Dosierung der verabreichten Substanzen zu Versuchsbeginn und danach alle 48 Stunden gewogen.

4.2.2 Versuchsaufbau

Nachweis der Pgp Überexpression im fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell

Das fraktionierte Lithium-Pilocarpin-Modell stellt eine Möglichkeit dar, die Pgp-Überexpression im Tiermodell durch Auslösung eines *Status epilepticus* (SE) zu induzieren (VOLK et al. 2004). Zur Re-Etablierung des fraktionierten Lithium-Pilocarpin Modells in München erfolgte zunächst der erfolgreiche Nachweis der Pgp-Überexpression im SE-Modell. Der Versuchsansatz zum Nachweis der Überexpression entsprach vom Ablauf den späteren Versuchen, nur das keine Substanz getestet worden ist.

Versuch der Prävention der Pgp-Expression mittels COX-2-Inhibition

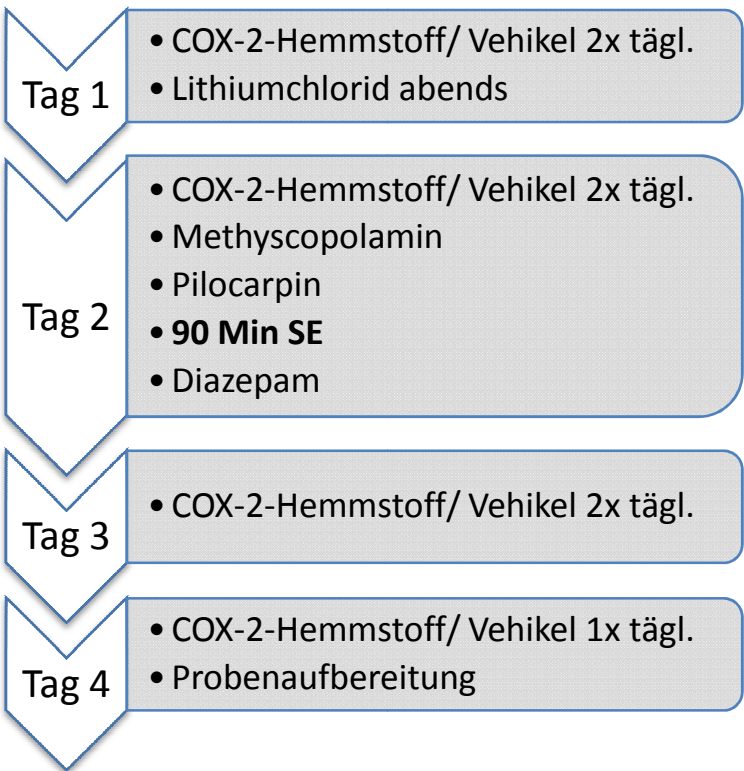


Abbildung 4.3 Versuchsablauf. Dargestellt ist der viertägige Versuchsablauf zur Prävention der Pgp-Überexpression im fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell

Der tierexperimentelle Anteil des Versuchs dauerte vier Tage und der Ablauf war bei der Behandlung mit NS-398 und Celecoxib gleich (Abbildung 4.3). Um die benötigte Anzahl von Tieren zu erreichen, setzten sich die Versuche mit Celecoxib und NS-398 jeweils aus mehreren Einzelversuchen zusammen. Die Versuchstiere wurden in eine Substanzgruppe, eine Pilocarpingruppe und eine Kontrollgruppe unterteilt. Alle drei Gruppen wurden drei Tage lang morgens und abends und am vierten Tag nur morgens behandelt.

Dabei erhielt nur die Substanzgruppe den selektiven COX-2-Hemmstoff Celecoxib oder NS-398 intraperitoneal verabreicht (Tabelle 4.4). Die anderen beiden Gruppen erhielten nur die Vehikel-Lösung, also eine 10%ige DMSO-Lösung oder eine 20%ige Cremophor EL Lösung von 35°C. Um den Einfluss circadianer Einflüsse möglichst gering zu halten, erfolgten die Injektionen morgens und abends im gleichen Zeitraum (zwischen 8.30 Uhr und 9.30 morgens und abends zwischen 17.30 Uhr und 18.30 Uhr MEZ).

COX-2-Inhibitor	Dosierung	Lösungsmittel	Temperatur	Applikationsvolumen
Celecoxib	20mg/kg	10% DMSO	Raumtemp.	3ml/kg
NS-398	10mg/kg	20% CEL	35 °C	3ml/kg

Tabelle 4.4 Die Formulierung der COX-2-Inhibitoren. Aufgelistet sind die verwendeten COX-2-Inhibitoren inklusive der Dosierung, des verwendeten Lösungsmittels, Injektionstemperatur und Applikationsvolumen

Substanz	Dosierung	Lösungsmittel	Applikationsvolumen
Lithiumchlorid	127mg/kg	NaCl-Lsg (isoton)	3ml/kg
Methylscopolamin	1mg/kg	NaCl-Lsg (isoton)	3ml/kg
Pilocarpin	10/mg/kg	NaCl-Lsg (isoton)	3ml/kg
Diazepam	10mg/kg	Fertigarzneimittel	2ml/kg

Tabelle 4.5 Formulierung der zur Auslösung des SE verwendeten Substanzen. Dargestellt sind die zur Auslösung des SE verwendeten Substanzen, ihre Dosierungen, Lösungsmittel und Applikationsvolumina

Am ersten Tag erhielten alle Tiere 15 Minuten nach der abendlichen Behandlung mit NaCl einmalig eine Lithiumchloridinjektion (Tabelle 4.5). Die Induktion des Status epilepticus (SE) erfolgte am 2. Versuchstag ausschließlich bei der Substanz- und der Pilocarpingruppe. Dazu wurden den Tieren dieser beiden Gruppen 13,5 h nach der Lithiumchloridinjektion am Morgen des 2. Versuchstages einmalig Methylscopolamin injiziert (Tabelle 4.5). Das nicht ZNS-gängige Parasympatholytikum Methylscopolamin reduziert die peripheren Nebenwirkungen des genau 30 Minuten später verabreichten Parasympathomimetikums Pilocarpin. Die Pilocarpin-Applikation (Tabelle 4.5) wurde bis zum Eintritt des Status epilepticus (SE) exakt alle 30 Minuten jedoch maximal 12mal wiederholt. Der SE wurde dann nach genau neunzig Minuten mit Diazepam (Tabelle 4.5) unterbrochen. Dazu wurde Diazepam bei gleicher Dosierung alle 5 Minuten nachdosiert bis die Anfallsaktivität vollständig abgeklungen war. Sofern sich nach der zwölften Pilocarpin-Injektion kein SE eingestellt hatte, wurden die Tiere weitere neunzig Minuten beobachtet und erhielten abschließend eine einmalige Diazepam-Applikation. Diese Tiere blieben in der weiteren Auswertung unberücksichtigt. Die Kontrollgruppe erhielt anstatt der Methylscopolamin- und der Pilocarpininjektion jeweils nur das Lösungsmittel (0,9% NaCl). Neunzig Minuten danach wurde einmalig Diazepam (Tabelle 4.5) injiziert. Am Abend des zweiten und im Verlauf des dritten Tages verhinderte die subkutane Applikation 0,9%iger NaCl-Lösung die Dehydratation der Tiere.

4.2.3 Beurteilung des Status epilepticus (SE)

Das Chemokonvulsivum Pilocarpin ermöglicht die Induktion eines Status epilepticus (SE). Mit der ersten Pilocarpininjektion wurde das Verhalten der Tiere beobachtet und protokolliert. Zur optimalen Beobachtung wurden die Tiere in ein Glasterrarium mit einer Kantenlänge von 110 cm verbracht. Jeder Protokollant erfasste dabei nicht mehr als 8 Einzeltiere. Es wurden Zeitpunkt, Anfallsschwere und Anfallsdauer schriftlich festgehalten. Dabei wurden fokale Anfälle von generalisierten Anfällen unterschieden. Die Einteilung erfolgte auf einer Skala (Stadium I-V) nach Racine (1972), modifiziert nach Löscher und Schmidt (1988) (Tabelle 4.6). Die Stadien I-III gelten als fokale Anfälle, die Stadien IV-V als generalisierte Anfälle. Erst eine mindestens zwanzig minütige Anfallsaktivität oder Aneinanderreihung von generalisierten Anfällen, ohne dass das Tier zwischenzeitlich zu Bewusstsein kommt, gilt als *Status epilepticus* (SE). Für nachträgliche Analysen wurde der gesamte Versuch auf Video (Panasonic, NV-GS 75, 3CCD) aufgezeichnet.

Krampfschwere	Anfallscharakteristika	
Stadium I	Immobilität, schwacher Faszialklonus (stereotypes Schnüffeln, Schließen des ipsilateralen Auges)	Fokale Anfallsaktivität
Stadium II	Starker Faszialklonus (Kopfnicken, Kopfbewegung)	
Stadium III	Unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium (IV)	Bilateraler Vorderextremitätenklonus ohne Aufrichten aber mit seitlichem Wegdrehen des Rumpfes	Generalisierte Anfallsaktivität
Stadium IV	Aufrichten des Rumpfes und bilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium V	Aufrichten des Rumpfes und bilateraler Vorderextremitätenklonus, Verlust der Stellreflexe	

Tabelle 4.6: Anfallsstadien und –charakteristika. Bezüglich der Schwere der Krämpfe werden 5 Stadien unterschieden. Dargestellt sind die typischen Anfallscharakteristika, die zur Einteilung führen. Die Stadien I-III werden aufgrund ihrer Lokalisation in fokale und die Anfälle IV-V aufgrund ihrer Lokalisation in generalisierte Anfälle eingeteilt (nach RACINE 1972, modifiziert von LÖSCHER, 1988)

4.2.4 Probengewinnung

Exakt eine Stunde nach der morgendlichen Behandlung am vierten Tag wurden alle Versuchstiere mit Hilfe einer Guillotine dekapitiert. Der Schädel wurde mittels einer Zange geöffnet und die nativen Gehirne unter Zuhilfenahme einer Pinzette vorsichtig aus der Schädelkalotte präpariert.

Das Gehirn wurde in Tissue Freezing Medium[®] (Leica Microsystems, Nussloch) in ein dafür hergestelltes Aluminiumgefäß eingebettet und mittels 2-Methylbutan (Sigma, Taufkirchen) eingefroren. Das 2-Methylbutan war vorher durch flüssigen Stickstoff auf eine Temperatur von ca. -80 °C gekühlt worden.

Der Vorgang der Gehirnentnahme dauerte maximal zwei, der Tiefgefriervorgang maximal drei Minuten. Ein zu schneller Gefriervorgang führt zu Gewebeschädigungen, ein zu langsamer Gefriervorgang verformt das native Gewebe. Das so eingefrorene Gewebe wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.2.5 Probenaufbereitung

Zur Vorbereitung des Schneidevorgangs wurden die Gewebeproben einige Stunden vor Beginn des Schneidevorgangs in den Kryostaten verbracht. Die Gewebeproben der Celecoxib-Gruppe wurden dazu an dem Kryostaten 2800 Frigocut N (Leica, München), die Gewebeproben der NS-398-Gruppe am HM560 (Microm, Walldorf) geschnitten. Nach manueller Entfernung des Einbettmediums mit Hilfe eines Skalpells wurden die Gehirne aufgefroren, auf 14 µm Dicke geschnitten und anschließend auf beschriftete HistoBond[®] Adhäsionsobjektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgezogen. Der Schneidevorgang erfolgte bei einer Objekttemperatur von -19 °C und einer Messertemperatur von -17 °C. Jede einzelne Gewebeprobe wurde ohne Verzögerung geschnitten. Die bereits fertigen Gewebeschnitte eines Gehirns wurden bei -20 °C im Kryostaten zwischengelagert. Sobald ein Gehirn fertig geschnitten war, wurden die Schnitte bis zur immunhistologischen Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.3 Immunhistologie

Bei den folgenden Untersuchungen wurden monoklonale und polyklonale Antikörper verwendet. Monoklonale Antikörper werden von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie produziert und richten sich gegen ein einzelnes Epitop (Molekülabschnitt eines Antigens). Polyklonale Antikörper binden hingegen an mehrere Epitope, weswegen sie unspezifischer sind als die aus B-Zellklonen stammenden monoklonalen Antikörper. Durch ihre unspezifische Bindung gelten sie jedoch als weniger störanfällig, da auch bei Zerstörung eines Epitops der Nachweis des Proteins weiterhin möglich ist. Die Epitopspezifität der verwendeten Antikörper MDR1 (Santa Cruz Biotechnology) und C219 (Calbiochem, Bad Soden) war zuvor im Rahmen einer anderen Arbeit getestet worden (VOLK et al. 2004; VOLK et al. 2005).

Die folgenden Protokolle kamen bei den zu vergleichenden Gruppen an allen Gehirnschnitten gleichzeitig zur Anwendung. Dadurch wurde die methodische Varianz so niedrig wie möglich gehalten. Um ein optimales Färbeergebnis zu erzielen, wurden die Schnitte je nach verwendetem Antikörper unterschiedlich vorbehandelt.

- Für die Färbung mittels des MDR1-Antikörpers wurden die mit den Gehirnschnitten versehenen Objektträger zuerst bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in frischem Aceton fixiert und über Nacht erneut getrocknet.
- Für die Färbung mittels des C-219-Antikörpers wurden die Objektträger für 10 Min bei -20 °C in Aceton fixiert

Standardfärbeprotokoll

Zuerst wurden die Schnitte in Tris-gepufferter 0,9%iger Natriumchloridlösung bei pH 7,6 (TBS) mehrmals gewaschen. Anschließend erfolgte eine dreißig minütige Inkubation in 0,5% H₂O₂, wodurch die endogene Peroxidaseaktivität zerstört wird. Danach wurden die Objektträger erneut mit TBS gewaschen und zur weiteren Behandlung in eine Immunhistoapparatur eingespannt (Shandon Sequenza, Thermo-Electron Corporation, Dreieich). Zur Verhinderung unspezifischer Reaktionen der Antikörper wurden die Schnitte für sechzig Minuten in Blocklösung und direkt

anschließend bei 4°C für ca. 14 h in das in Carrier-Solution gelöste, primäre Antiserum verbracht (Tabelle 4.7).

Am nächsten Tag wurde erneut mehrmals mit TBS gewaschen. Danach erfolgte eine neunzig minütige Inkubation mit dem in Carrier-Solution gelöstem sekundären Antikörper. Durch erneutes Spülen mit TBS wurden anschließend ungebundene sekundäre Antikörper entfernt. Darauf folgte eine neunzig minütige Behandlung mit Streptavidin-Meerettich-Peroxidase (HRP, 1:375 in TBS, DAKO, Hamburg), die die Inkubation beendete. Zur Entfernung der überschüssigen Meerettich-Peroxidase erfolgte danach ein weiterer Waschschrift in TBS. Die Antigenbindung wurde in einem fünfzehn minütigem Färbeschritt mittels der schwermetallverstärkten 3,3'-Diaminobenzidinreaktionslösung sichtbar gemacht (0,05% 3,3'-Diaminobenzidin, 0,6% Ammonium-Nickel-Sulfat, 0,01% H₂O₂ gelöst in TBS). Mehrmaliges Spülen mit TBS und anschließend mit destilliertem Wasser beendete die Färbereaktion. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht getrocknet, mit Entellan (Merck, Darmstadt) oder Eukitt® (Kindler, Freiburg) eingedeckt und erneut getrocknet.

Primärer Antikörper	MDR1, Ziege-anti pgp	C-219, Maus-anti-Pgp
Klonalität	polyklonal	monoclonal
Hersteller	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA	Calbiochem, Bad Soden
Konzentration	1:30	1:100
Sekundärer Antikörper	Biotinylierter Esel-anti-Ziege Antikörper	Biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus Antikörper
Hersteller	Southern Biotech	DAKO, Hamburg
Konzentration	1:400	1:500
Verwendete Carriersolution	TBS, 1% Esel Serum, 1% Rinderserum (BSA) und 0,3% Triton X-100	TBS, 1% Kaninchen Serum, 1% Rinderserum (BSA) und 0,3% Triton X-100
Verwendete Blocking Solution	TBS mit 3 % bovinem Serumalbumin, 0,3% Triton X-100 und 11% Eselserum	TBS mit 3 % bovinem Serumalbumin, 0,3% Triton X-100 und 11% Kaninchenserum

Tabelle 4.7: Verwendete Antikörper-Systeme

A

Figure 27

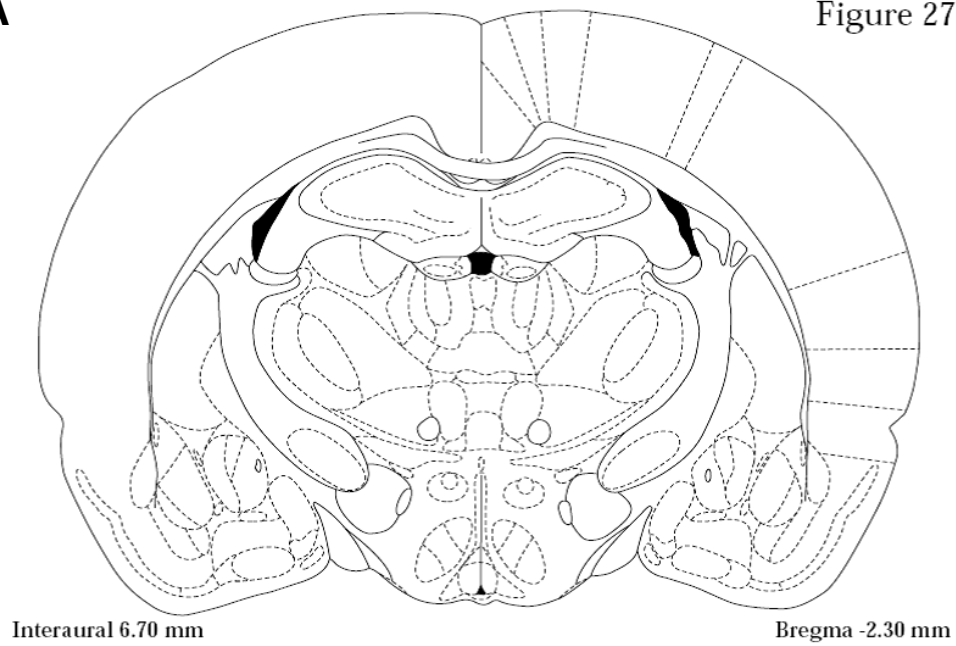
**B**

Figure 33

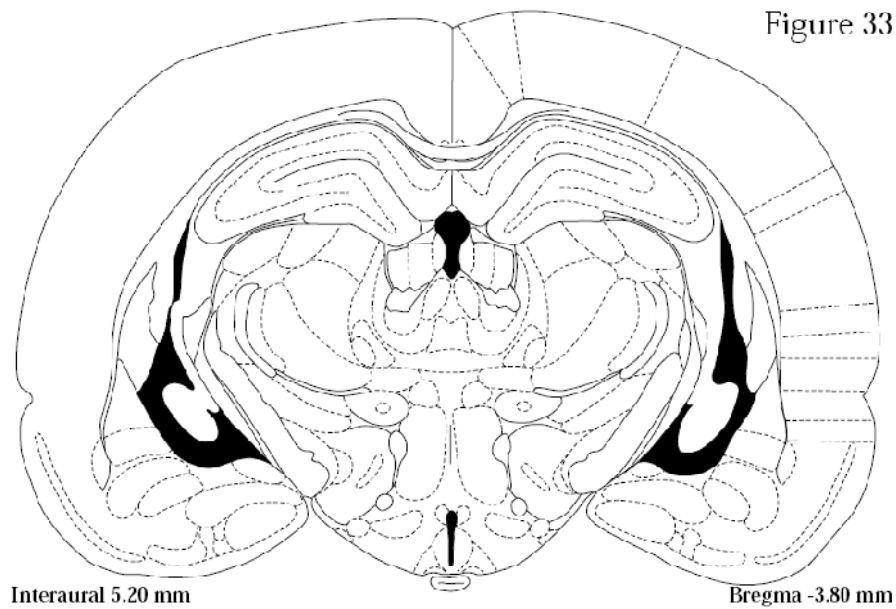


Abbildung 4.4 Auszug aus Paxinos & Watson (2005): Dargestellt sind die Schnittebenen Bregma -2,3 mm (A) und Bregma -3,8 mm (B). Die drei Ebenen Bregma -2,3 mm (A); Bregma -3,8 mm (B) und Bregma -5,8 mm (C) wurden zur weiteren Auswertung herangezogen.

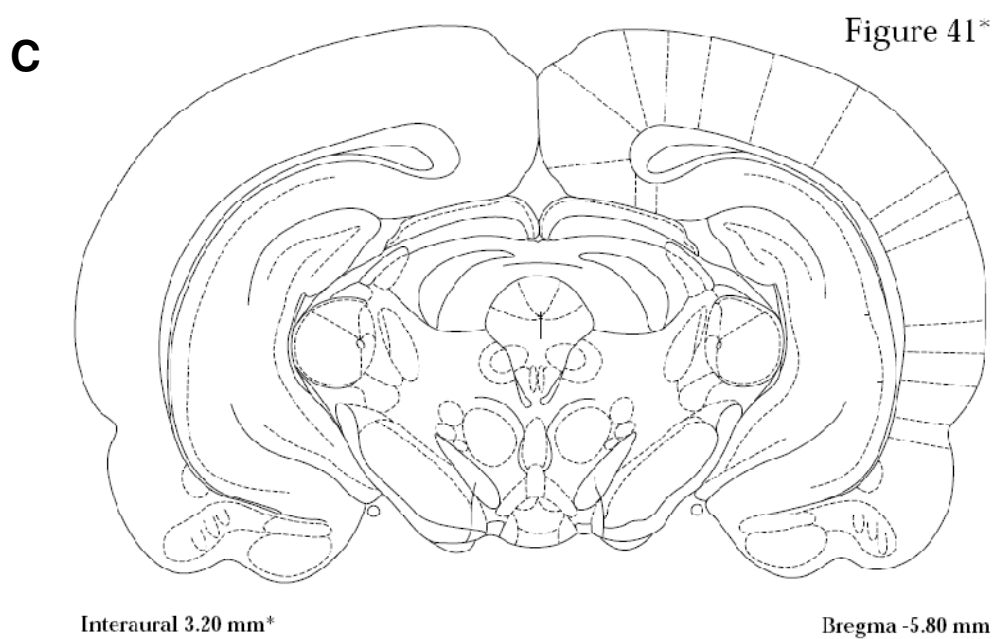


Abbildung 4.5 Auszug aus Paxinos & Watson (2005): Dargestellt ist die Schnittebene Bregma -5,8 mm (C). Die drei Ebenen Bregma -2,3 mm (A); Bregma -3,8 mm (B) und Bregma -5,8 mm (C) wurden zur weiteren Auswertung herangezogen.

4.3.1 Auswertung und Statistik

Die immunhistologische Auswertung erfolgte verblindet. Nach PAXINOS und WATSON (2005) wurden die Schnittebenen definiert, die zur Auswertung verwendet worden sind.

Messung der immunhistologisch markierten Fläche

Ein Computer basiertes Bildanalysesystem wurde zur Messung der immunhistologisch markierten Fläche und der optischen Dichte (OD) herangezogen (VOLK et al. 2004). Signifikante Hinweise auf Veränderungen der Pgp-Expression können sich hinsichtlich der histologisch markierten Flächenausdehnung und/oder hinsichtlich der optischen Dichte der markierten Fläche ergeben. Eine Vergrößerung der Pgp-markierten Fläche bedeutet eine Zunahme der Pgp-Expression in Endothelzellen, deren Pgp-Expression normalerweise unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Eine Zunahme der optischen Dichte der markierten Fläche bedeutet eine Verstärkung des Pgp-Signals und somit einer Zunahme der Pgp-Expression in sämtlichen Endothelzellen.

Dazu wurden ein Olympus BH2-Mikroskop mit einer Plan-Neofluar Linse (Zeiss, Göttingen), eine CCD (single chip charge couple device)-Farbkamera (AxioCam MRc Zeiss, Göttingen) und ein Computer mit einem AMD Athlon™ 64 Processor verwendet. Der Prozessor ist mit einer bildgebenden Interfacekarte (AxioCam MR Interface Rev.A, Zeiss, Göttingen) ausgestattet. Die gesamte Anlage wurde jeweils eine Stunde vor der Messung in Betrieb genommen, da die Betriebstemperatur der Kamera Einfluss auf das optimale Signal-Rausch-Verhältnis hat. Die Analyse fand bei 400facher Vergrößerung und einer Auflösung von 1300x1030 Pixeln statt. Die Auswertung erfolgt mittels der Bildanalysesoftware KS400 (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision). Die optische Dichte wurde direkt gemessen, nachdem das System mit Hilfe eines OD-Standard (Calibration of Step Tablet No. 507ST101, Eastman Kodak Company, USA) kalibriert worden war. Die Beleuchtungsstärke des Mikroskops konnte mittels dieses OD-Standards geprüft und konstant gehalten werden, wobei eine maximale Abweichung von 5% von der Messkurve toleriert worden ist. Die eingelesenen Bilder wurden auf optische Distorsion korrigiert (Shading correction). Dazu wurde ein freier Bereich eines Objektträgers abgemessen und der entstandene Wert bei allen gemessenen Objekten abgezogen. Dadurch konnten Helligkeitsungleichheiten ausgeglichen werden. Zur Unterscheidung des Pgp-Signals vor dem jeweiligen Hintergrund musste ein Schwellenwert festgelegt werden. Die Aufgabe des Schwellenwertes ist es deutlich zwischen Hintergrund und markierter Fläche zu unterscheiden. Zu diesem Zweck kommt der „Treshold“ zum Einsatz. Der Treshold definiert diejenigen Farbwerte, die als markierte Fläche gemessen werden sollen. Um einen für die jeweilige Färbung optimalen Treshold zu erhalten, wurde für jede Region jedes Schnittes vor der Messung der Treshold bestimmt. Die Mittelwerte aller Schnitte einer Region ergaben den Treshold, mit dem anschließend die jeweilige Region bei allen Schnitten einer Schnittebene gemessen worden ist.

Bildanalysesysteme mit fester Schwelle zeigen vergleichbare Objektivität, solange das Hintergrundsignal nicht stärker als $\pm 3\%$ variiert (RIEUX et al. 2002). Deswegen sind alle Schnitte einer Messreihe gleich behandelt worden. Nur deutliche Signale oberhalb des Schwellenwerts wurden in die Auswertung miteinbezogen, wobei zur Hintergrundkorrektur der OD Messung der Bereich als Hintergrund definiert worden ist, der unter dem Schwellenwert lag. Die mittlere OD des Hintergrundsignals wurde

dann von der mittleren OD des Pgp-positiven Signals abgezogen, um eine Hintergrund-korrigierte OD des Pgp-positiven Signals zu erlangen.

Es wurden folgende Gehirnareale der Ebenen relativ zu Bregma -2,3 mm; -3,8 mm und -5,8 mm untersucht:

- der Cortex (10)
- der hippocampaler Hilus (3)
- die hippocampale Körnerzellschicht (Gyrus Dentatus (DG)) (10) und
- ein Teilbereich des hippocampalen Ammonshorns (Cornu Ammonis (CA3)) (5)

Es wurden 3, 5 oder 10 Messfelder mit einer Größe von $43,434 \mu\text{m}^2$ in die jeweiligen Regionen gelegt. Anschließend wurde der Mittelwert jeder Region für jeden Schnitt bestimmt und statistisch miteinander verglichen.

Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 5 für Windows. Generell erfolgt die Angabe der Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler (mean \pm **S**tandard **E**rror of the **M**ean). Es wurde mit dem Test von Kolmogorov und Smirnov (KS normality test) zuvor getestet, ob die Daten nach Gauß normalverteilt sind. Anschließend wurde beim Vorliegen parametrischer Daten der ungepaarte t-Test verwendet. Bei nicht parametrischen Daten wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Dabei wurde grundsätzlich zweiseitig getestet. Wenn die bekannte Literatur jedoch ausschließlich eine Veränderung der Daten in eine Richtung erwarten ließ, wurde einseitig getestet.

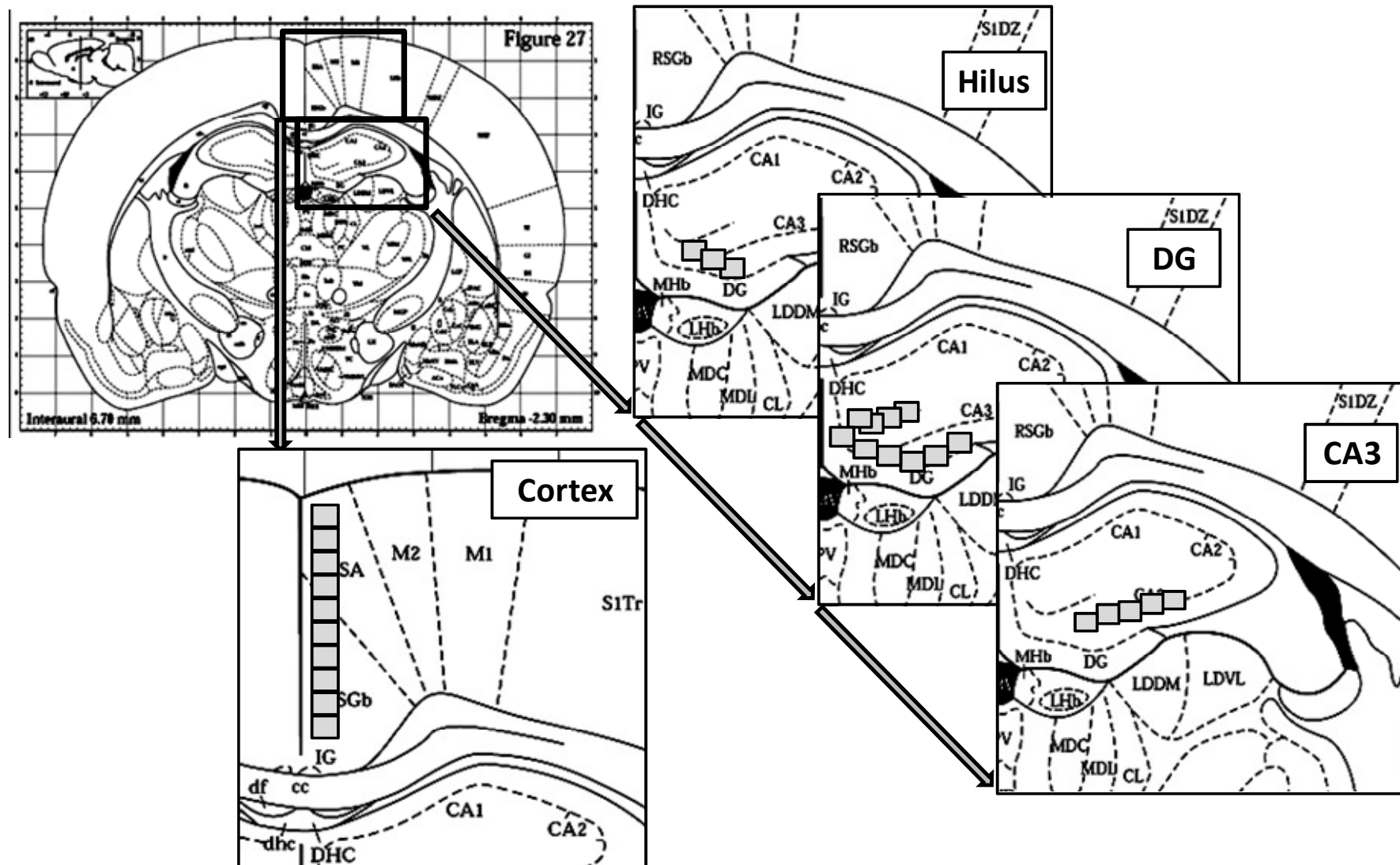


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Messfelder die zur Pgp-Auswertung herangezogen worden sind. Gezeigt ist die Region Bregma -2,3 mm nach PAXINOS u. WATSON in der Totale und Ausschnittsvergrößerungen des Hippocampus und des Cortex. Die grau unterlegten Felder symbolisieren die Messfelder der jeweiligen Region (Hilus, hippocampale Körnerzellschicht (Dentate Gyrus (DG)), hippocampales Ammonshorn (Cornu Anubis (CA3)). Im Cortex und DG wurden zehn Messfelder, im Hilus 3 Messfelder und in der CA3 5 Messfelder von einer Größe von $43,434 \mu\text{m}^2$ vermessen.

4.4 Verträglichkeitsuntersuchung der chronischen Celecoxib-Therapie

In chronischen Tiermodellen wird zukünftig die Möglichkeit der Prävention der Pharmakoresistenz durch selektive COX-2-Hemmung geprüft werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Verträglichkeit einer chronischen Celecoxib-Applikation getestet. Dazu wurden drei Versuchstiere täglich zwei Mal über einen Zeitraum von vier Wochen mit Celecoxib (20mg/kg) behandelt. Während dieses Zeitraums wurde das Allgemeinbefinden der Tiere zwei Mal täglich protokolliert. Nach Ablauf der vier Wochen wurden die Tiere getötet und es wurde der Abdominalraum auf pathologische Veränderungen untersucht.

4.5 Die COX-2-Aktivität im SE Modell

Nach Auslösung eines SE (Kapitel 4.2.2) wurden einigen NS-398-Versuchstieren (NS-398-, Pilocarpin- & Kontrollgruppe) nach der Dekapitation die Gehirne nativ entnommen und direkt anschließend auf eine mittels Trockeneis vorgekühlte Arbeitsfläche verbracht. Die Arbeitsfläche war mit einem Filterpapier versehen, um ein Anfrieren der Gehirne zu verhindern. Danach wurden die Gehirne in die linke und rechte Hemisphäre geteilt und jeweils das Kleinhirn, der olfaktorische Bulbus, der frontale Cortex, der parahippocampale Cortex, der dorsale und ventrale Hippocampus, das Caudate Putamen und der verbleibende Cortex präpariert. Die einzelnen Gehirnregionen wurden gewogen, in Eppendorf-Gefäße verbracht und bis zur weiteren Behandlung bei -80 °C gelagert.

Anschließend wurde mittels des Prostaglandin E₂ Express EIA Kits (Cayman Chemicals, Michigan, USA) die PGE₂ Aktivität im Hippocampus nachgewiesen. Dazu wurde nach den Herstellerangaben des Kits verfahren.

4.6 Verwendete Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Ammonium Nickel Sulfat Hexahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs
Aqua ad injectabilia	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Azeton	Baker, Deventer, Niederlande
Celecoxib (Celebrex[®])	Pfizer, Karlsruhe
Chremophor EL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
3,3 Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Diazepam (Diazepam-Ratiopharm[®])	Ratiopharm, Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Entellan-Eindeckmittel	E. Merck AG, Darmstadt
Esel-Anti-Ziege Antikörper biotinyliert	DAKO, Hamburg
EUKITT[®]	Kindler, Freiburg
Glycerin, wasserfrei	Applichem, Darmstadt
Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, biotyniliert	DAKO, Hamburg
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Maus-Anti-Pgp Antikörper (C-219)	Calbiochem, Bad Soden
MDR1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Methylscopolambromid	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München
Natrium-Chlorid-Lösung (isoton)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
NS-398	Cayman Chemical, Michigan, USA
Pilocarpinhydrochlorid	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München

Tabelle 4.8: Verwendete Substanzen und Bezugsquelle

Substanz	Bezugsquelle
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München
Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)	DAKO, Hamburg
Tissue Freezing Medium	Jung, Nussloch
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Xylol	Roth, Hamburg

Tabelle 4.9: Verwendete Substanzen und Bezugsquelle

5 Ergebnisse

5.1 Celecoxib

5.1.1 Auslösung und Verlauf des Status epilepticus

Die Induktion eines Status epilepticus geht im fraktionierten Lithium-Pilocarpinmodell mit einer Überexpression von Pgp einher (VOLK et al. 2004). Um den Einfluss einer selektiven COX-2-Hemmung auf die Pgp-Expression in vivo darzustellen, wurde zur Induktion eines Status epilepticus insgesamt 40 Tiere Pilocarpin in fraktionierten Dosen appliziert. Sechzehn Tiere wurden während des gesamten Versuches zwei Mal täglich mit Celecoxib behandelt (Celecoxibgruppe). Die restlichen 24 Tiere erhielten anstelle von Celecoxib die entsprechende Vehikellösung (Pilocarpingruppe). Sieben Tiere bekamen bei ansonsten gleicher Behandlung mit Vehikellösung kein Pilocarpin injiziert und entwickelten demzufolge auch keinen Status epilepticus (Kontrollgruppe).

Bereits nach der ersten Injektion von Pilocarpin zeigten vereinzelt Tiere beider Gruppen fokale Anfälle. Sofern nach einem ersten generalisierten Anfall in einem kurzen Abstand ein zweiter generalisierter Anfall beobachtet werden konnte, entwickelten die Ratten eine anhaltende generalisierte Anfallsaktivität (Status epilepticus).

In 94% (15 von 16) der mit Celecoxib behandelten Tiere konnte mit Pilocarpin ein Status epilepticus induziert werden. In der Pilocarpingruppe wurde ein Status epilepticus erfolgreich bei 83% (20 von 24 Tieren) induziert. Zwischen diesen beiden Gruppen konnte hinsichtlich der benötigten Menge an Pilocarpin zur Induktion des Status epilepticus kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In den Celecoxib behandelten Tieren wurde zur Auslösung eines Status epilepticus eine Pilocarpindosis von $35,33 \pm 4,77$ mg/kg benötigt (mean \pm SEM). Die mit Vehikel behandelten Tiere benötigten eine Dosis von $34,50 \pm 0,52$ mg/kg Pilocarpin (mean \pm SEM). Der Status epilepticus trat bei der mit Celecoxib behandelten Gruppe nach $102,20 \pm 13,79$ Minuten (mean \pm SEM) und bei der Pilocarpingruppe nach $90,55 \pm 15,54$ Minuten ein (mean \pm SEM).

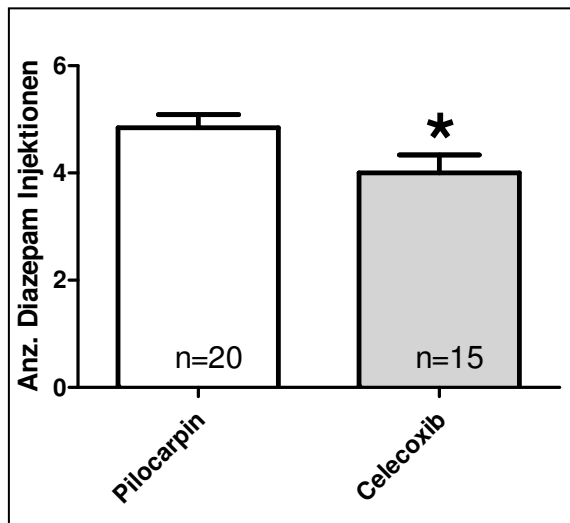


Abbildung 5.1 Mit Celecoxib vorbehandelte Tiere benötigen signifikant weniger Diazepam zur Unterbrechung des Status epilepticus. Dargestellt ist die zur Unterbrechung der Krampfaktivität benötigte Anzahl an Diazepam-Injektionen. Pro Injektion wurde eine Dosis von 10 mg/kg injiziert (*: $p < 0,05$ Pilocarpin versus Celecoxib).

Zur Unterbrechung der Krampfaktivität wurde Diazepam im Abstand von fünf Minuten verabreicht, bis die Krampfaktivität vollständig abgeklungen war. Die mit Celecoxib behandelten Tiere benötigten zur Unterbrechung des Status $40,00 \pm 3,38$ mg/kg (mean \pm SEM) Diazepam und damit signifikant weniger Diazepam als die Vergleichsgruppe mit $48,50 \pm 2,44$ mg/kg (mean \pm SEM).

Die Mortalität betrug in den 24 Stunden nach der Induktion des SE in der Celecoxibgruppe 40% (6 von 15 Tieren) und in der Pilocarpingruppe 45% (9 von 20 Tieren). Ein Vergleich der Mortalitätsrate ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Fisher's exact test $p > 0,05$).

5.1.2 Beeinflussung der Pgp-Expression

Nachdem die Gehirne am Kryostaten geschnitten worden waren, konnte der Multidrugtransporter Pgp in den cerebralen Endothelzellen aller Ratten mittels des Pgp-Antikörpers MDR1 immunhistologisch sichtbar gemacht werden. In der Computer basierten Messung der Pgp-markierten Fläche kann sowohl die Gesamtheit der Pgp-markierte Fläche, als auch die Färbeintensität (optische Dichte) der Pgp-markierten Fläche Aufschluss auf Veränderungen der Pgp-Expression geben.

Zur Messung der Fläche und optischen Dichte der Pgp-markierten Fläche wurden der hippocampale Hilus, die hippocampale Körnerzellschicht und der Cortex 2,3 mm, 3,8 mm und 5,8 mm posterior zu Bregma vermessen. In den genannten Regionen der Ebene 2,3 mm posterior zu Bregma konnte eine signifikante Vergrößerung der Pgp-markierten Fläche der Pilocarpingruppe um 190% bis 223% gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden. Im Cortex der Ebene 5,8 mm posterior zu Bregma wurde zwischen der Kontroll- und der Pilocarpingruppe eine signifikante Vergrößerung der Pgp-markierten Fläche um 171% gemessen. In allen vermessenen Regionen der Schnittebene 2,3 mm posterior zu Bregma und im Cortex der Schnittebene 5,8 mm posterior zu Bregma verhinderte die Behandlung mit dem COX-2-Hemmstoff Celecoxib die anfallsinduzierte Induktion der endothelialen Pgp-Expression. Die Pgp-markierte Fläche der mit Celecoxib behandelten Tiere entsprach in etwa dem Kontrollniveau. In der hippocampalen Körnerzellschicht der Schnittebene 2,3 mm posterior zu Bregma und im Cortex der Schnittebenen 2,3 mm und 5,8 mm posterior zu Bregma führte die Behandlung mit Celecoxib zu einer signifikanten Reduktion der Pgp-markierten Fläche im Vergleich zur Pilocarpingruppe.

Hinsichtlich der optischen Dichte der Pgp-markierten Fläche konnten keine Unterschiede bei den Versuchsgruppen festgestellt werden. Durch die Induktion eines Status epilepticus kam es weder zu einer Intensivierung der optischen Dichte in der Pilocarpingruppe, noch konnte eine Veränderung bei den mit Celecoxib behandelten Tieren festgestellt werden.

Die Pgp-Expression blieb auf die Endothelzellen begrenzt. In keiner der untersuchten Regionen konnte eine Pgp-Expression in parenchymalen Zellen festgestellt werden.

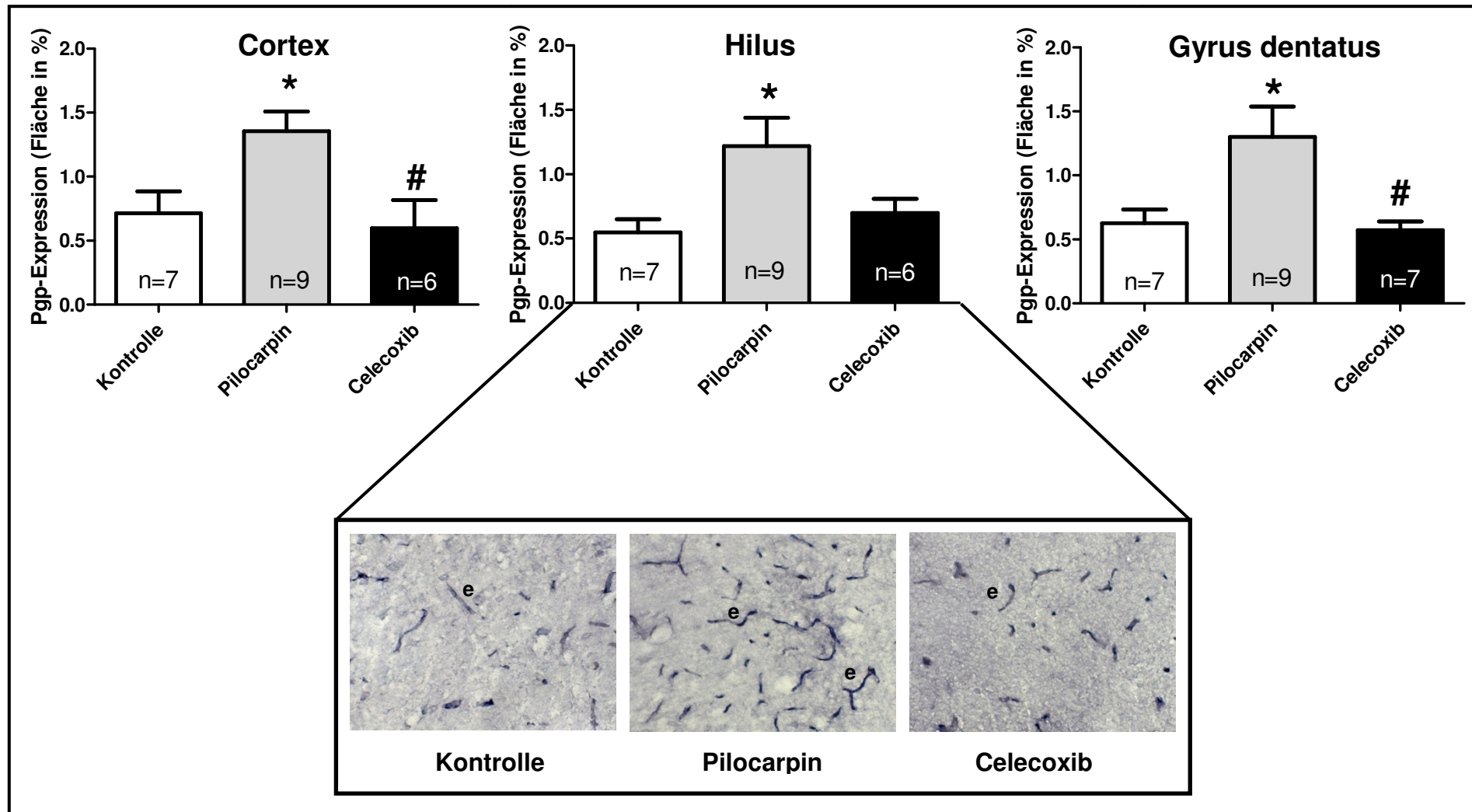


Abbildung 5.2 Pgp-Expression im Status epilepticus-Modell nach Celecoxib. Pgp-Expression bei Kontrolltieren ohne Status epilepticus, Celecoxib behandelten und nicht behandelten Ratten 24h nach Status epilepticus. Dargestellt sind der Cortex, der hippocampale Hilus und die hippocampale Körnerzellschicht (Gyrus dentatus) 2,3 mm posterior zu Bregma. Die Probenanzahl variiert, da durch Läsionen nicht immer sämtliche Regionen eines Schnittes ausgewertet werden konnten. (*): ungepaarter t test Pilocarpin versus Kontrolle $p < 0,05$; (#): ungepaarter t test Pilocarpin versus Celecoxib $p < 0,05$).

5.1.3 Verträglichkeitsuntersuchung der chronischen Celecoxib-Therapie

Um die Verträglichkeit einer chronischen Celecoxib-Applikation zu messen, wurden drei Versuchstiere täglich zwei Mal über einen Zeitraum von vier Wochen mit Celecoxib (20mg/kg) behandelt. Die tägliche Untersuchung des Allgemeinbefindens ergab bis auf gelegentliche geringgradige Schmerzreaktionen auf die Injektion keinen Befund. Auch die pathologische Untersuchung blieb befundfrei.

5.2 NS-398

5.2.1 Auslösung und Verlauf des Status epilepticus

Um den Einfluss des selektiven COX-2-Hemmstoffs NS-398 auf die Pgp-Expression zu untersuchen, wurde bei insgesamt 54 Tieren zur Auslösung eines Status epilepticus Pilocarpin in fraktionierten Dosen appliziert. Zweiundzwanzig Tiere wurden zeitgleich zwei Mal täglich mit NS-398 behandelt (NS-398-Gruppe). Die übrigen 32 Tiere erhielten die entsprechende Vehikellösung (Pilocarpingruppe). Bei 11 Tieren wurde bei ansonsten gleicher Behandlung mit Vehikellösung kein SE ausgelöst (Kontrollgruppe).

Bereits kurz nach der ersten Pilocarpininjektion konnte bei einzelnen Tieren beider Gruppen fokale Anfälle beobachtet werden. Sofern nach einem ersten generalisierten Anfall in kurzem Abstand ein zweiter generalisierter Anfall beobachtet werden konnte, entwickelten die Ratten einen fortwährenden generalisierten Anfall (Status epilepticus).

In 72% (16 von 22) der mit NS-398 behandelten Tiere konnte durch Pilocarpin ein Status epilepticus induziert werden. In der Pilocarpingruppe konnte ein Status epilepticus bei 63% der Tiere (20 von 32 Tieren) erfolgreich ausgelöst werden. Hinsichtlich der zur Auslösung des Status epilepticus benötigten Menge an Pilocarpin konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die mit NS-398 behandelten Tiere benötigten eine Menge von $39,38 \pm 6,02$ mg/kg (mean \pm SEM) Pilocarpin zur Auslösung eines Status epilepticus, die Tiere der Pilocarpingruppe benötigten $38,00 \pm 4,62$ mg/kg (mean \pm SEM). Bei der mit NS-398 behandelten Gruppe trat der Status epilepticus nach $106,00 \pm 18,07$ Minuten (mean \pm SEM) und bei der Pilocarpingruppe nach $99,80 \pm 14,16$ Minuten (mean \pm SEM) ein. Die Schwere des Status epilepticus war in beiden Gruppen vergleichbar.

Zur Unterbrechung der Krampfaktivität wurde Diazepam im Abstand von fünf Minuten verabreicht, bis die Krampfaktivität vollständig abgeklungen war. Die mit NS-398 behandelten Tiere benötigten zur Unterbrechung des SE $40,00 \pm 2,51$ mg/kg (mean \pm SEM) Diazepam, während die Pilocarpingruppe im Durchschnitt $40,63 \pm 3,47$ mg/kg (mean \pm SEM) benötigte.

In den achtundvierzig Stunden zwischen der Induktion des Status epilepticus und der Dekapitation betrug die Mortalität in der NS-398-Gruppe 25% (4 von 16 Tieren) und in der Pilocarpingruppe 35% (7 von 20 Tieren). Ein Vergleich der Mortalitätsrate ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Fisher's exact test $p > 0,05$). Achtundvierzig Stunden nach der Auslösung des Status epilepticus wurden die Tiere dekapitiert und die Gehirne nativ entnommen.

Von sechs Tieren der NS-398 Gruppe, fünf Tieren der Pilocarpingruppe und drei Tieren der Kontrollgruppe wurden der olfaktorische Bulbus, der Frontale Cortex, der parahippocampale Cortex, der Hippocampus, das Caudate Putamen und der verbleibende Cortex beider Hemisphären entnommen und zur weiteren Auswertung (Pgp-Western Blot) an eine kooperierende Arbeitsgruppe versandt. Die Hippocampus der rechten Hemisphäre wurde zum PGE₂-Nachweis verwendet (siehe Kapitel 5.2.3).

Die übrigen Gehirne wurden für die immunhistochemische Auswertung aufbereitet.

5.2.2 Beeinflussung der Pgp-Expression durch NS-398

Nachdem die Gehirne am Kryostaten geschnitten worden waren, konnte der Multidrugtransporter Pgp in den cerebralen Endothelzellen aller Ratten mittels des Pgp-Antikörpers C219 immunhistologisch sichtbar gemacht werden, nachdem die Färbung mit dem MDR1-Antikörper bei einigen Ratten ergebnislos geblieben war. Signifikante Veränderungen ergaben sich sowohl hinsichtlich der Ausdehnung der Pgp-markierten Fläche als auch der optischen Dichte.

Die Pgp-markierte Fläche wurde im hippocampalen Hilus, der hippocampalen Körnerzellschicht, der CA3-Region und dem Cortex in der Ebene 2,3 mm posterior zu Bregma bestimmt. Im hippocampalen Hilus und der hippocampalen CA3-Region war eine signifikante Ausdehnung der Pgp-gefärbten Fläche der Pilocarpingruppe gegenüber der Kontrollgruppe um 219-251% nachweisbar. Die statusinduzierte Vergrößerung der Pgp-markierten Fläche blieb von der Behandlung mit NS-398 unbeeinflusst. Die Ausdehnung der Pgp-markierten Fläche betrug im hippocampalen

Hilus, der hippocampalen Körnerzellschicht und der hippocampalen CA3 182-265% gegenüber der Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zur Ausdehnung der Pgp-markierten Fläche wurde die optische Dichte der Pgp-markierten Fläche durch NS-398 beeinflusst. Durch den Status epilepticus kam es in der Schnittebene 2,3 mm posterior zu Bregma zu einer signifikanten Intensivierung der optischen Dichte im hippocampalen Hilus, in der hippocampalen Körnerzellschicht und in der hippocampalen CA3-Region um 2-3%. In allen drei Regionen verhinderte die Behandlung mit dem COX-2-Hemmstoff NS-398 die anfallsinduzierte Induktion der endothelialen Pgp-Expression und hielt die Färbintensität der Pgp-markierten Fläche im hippocampalen Hilus und in der hippocampalen Körnerzellschicht auf Kontrollniveau.

Sowohl bezüglich der Ausdehnung der Pgp-markierten Fläche als auch hinsichtlich deren Färbintensität waren im Cortex keine signifikanten Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen feststellbar.

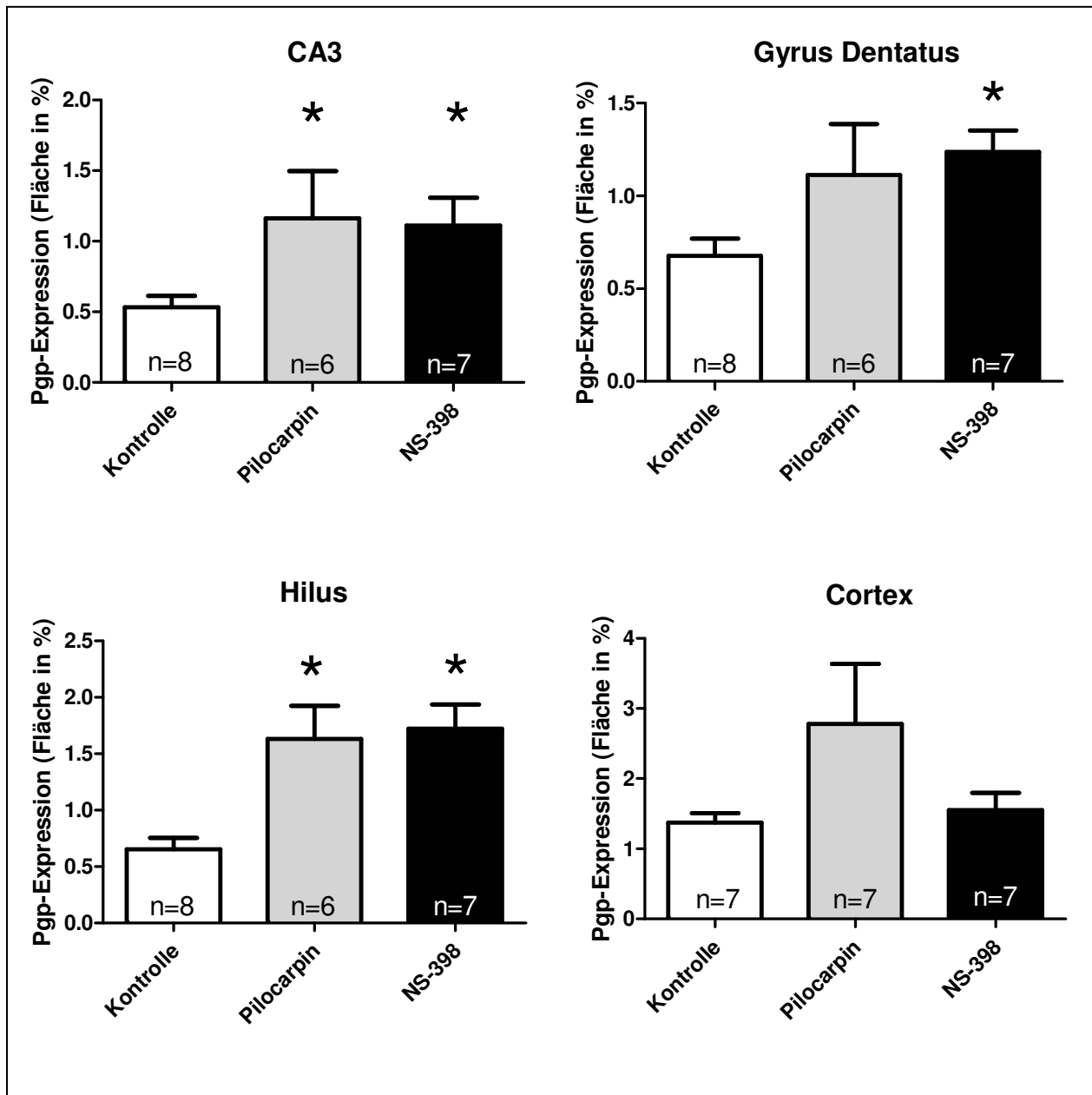


Abbildung 5.3 Grafische Darstellung der Ausdehnung der Pgp-markierten Fläche im Status epilepticus Modell mit NS-398. Dargestellt ist die Ausdehnung der Pgp-markierten Fläche bei Kontrollratten, NS-398 behandelten und nicht behandelten Ratten 24h nach einem Status epilepticus. Die Pgp-markierte Fläche wurde in transversalen Schnitten relativ zu Bregma -2,3 mm gemessen und in Relation zu dem gesamten Messfeld gesetzt. Pro Gehirnschnitt wurden pro Hemisphäre und Ratte drei bis zehn Messfelder in die zu messende Gehirnregion gelegt. Aus beiden Hemisphären wurde pro Tier ein Mittelwert bestimmt, der als gemessener Wert in die Gruppenwertung mit einging. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler (^(*) $p < 0,05$ Kontrolle versus Pilocarpin und Kontrolle versus NS-398).

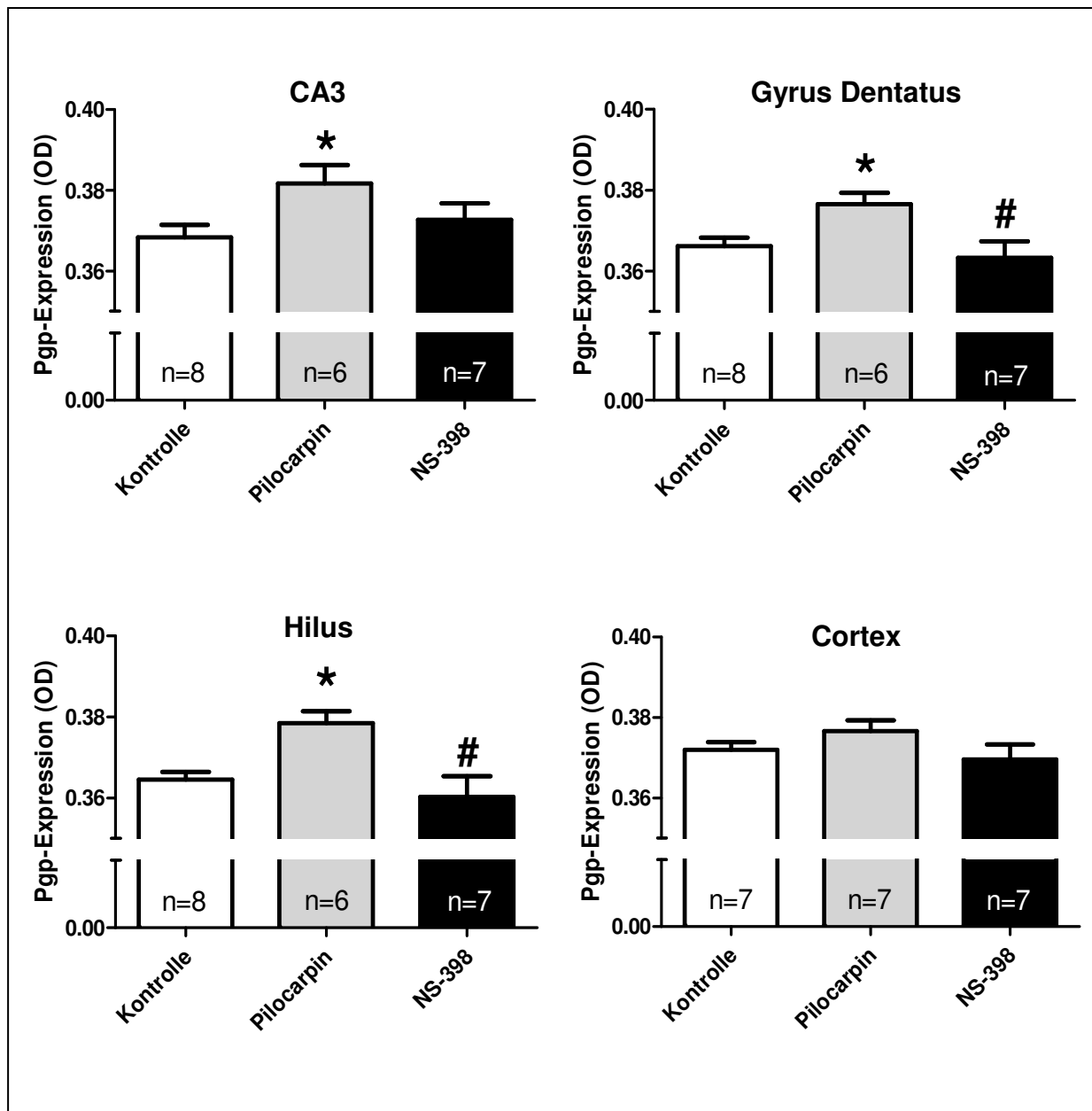


Abbildung 5.4 Grafische Darstellung der Färbeintensität (OD) der Pgp-markierten Fläche im Status epilepticus Modell mit NS-398. Dargestellt ist die Färbeintensität (OD) der Pgp-markierten Fläche bei Kontrollratten, NS-398-behandelten und nicht behandelten Ratten 24h nach einem Status epilepticus. Die Färbeintensität der Pgp-markierten Fläche wurde in transversalen Schnitten relativ zu Bregma -2,3 mm gemessen. Pro Gehirnschnitt wurden pro Hemisphäre und Ratte drei bis zehn Messfelder in die zu messende Gehirnregion gelegt. Aus beiden Hemisphären wurde pro Tier ein Mittelwert bestimmt, der als gemessener Wert in die Gruppenwertung mit einging. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler (*): $p < 0,05$ Kontrolle versus Pilocarpin; (#): $p < 0,05$ Pilocarpin versus NS-398).

5.2.3 Beeinflussung der PGE₂-Synthese

Von jeweils drei Tieren der zuvor beschriebenen drei Versuchsgruppen (Kontrolle, Pilocarpin und NS-398) wurden die Hippocampi der rechten Hemisphäre entnommen. Zur Überprüfung der Aktivität der COX-2 im Gehirn wurde darin mit Hilfe eines PGE₂-Kits die Menge an PGE₂ bestimmt. Pro 100mg Hippocampusgewebe konnte in der Kontrollgruppe $1,76 \pm 0,30$ ng (mean \pm SEM), in der Pilocarpingruppe $14,97 \pm 2,173$ ng (mean \pm SEM) und in der NS-398-Gruppe $1,147 \pm 0,36$ ng (mean \pm SEM) detektiert werden. Ausgelöst durch einen Status epilepticus kommt es folglich zu einer Erhöhung der PGE₂-Konzentration um 851%. Dieser Anstieg konnte durch den Einsatz des selektiven COX-2-Hemmstoffs NS-398 vollständig verhindert werden.

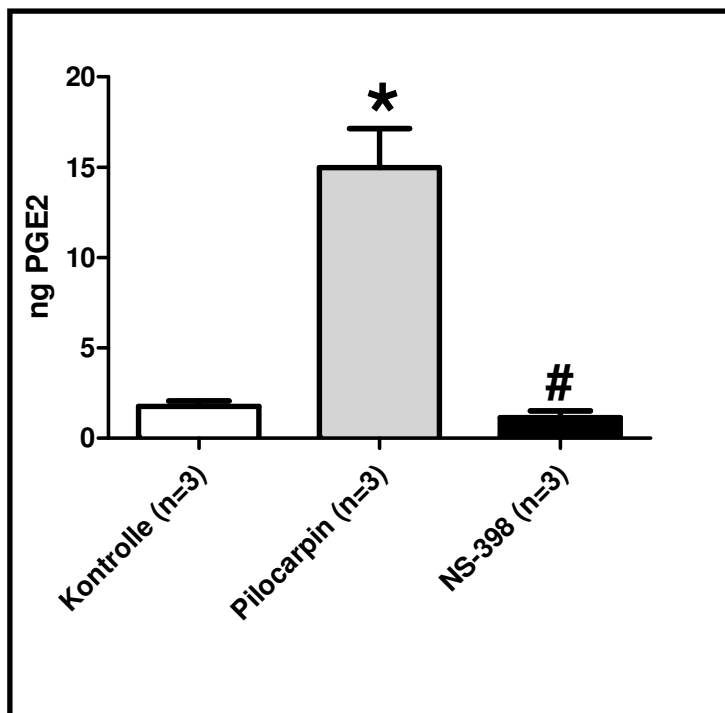


Abbildung 5.5 NS-398 verhindert die Status epilepticus induzierte PGE₂-Produktion im Hippocampus. Dargestellt ist die Menge an PGE₂ in ng/100mg Hippocampusgewebe in mit Vehikel- und NS-398-behandelten Ratten 48h nach Auslösung eines SE, sowie in Kontrollratten. (*): $p < 0,05$ Pilocarpin versus Kontrolle; (#): $p < 0,05$ Pilocarpin versus NS-398)

6 Diskussion

6.1 Prävention der Pgp-Überexpression durch eine selektive COX-2-Hemmung

Der Multidrug-Transporter Pgp transportiert in den Endothelzellen des Gehirns eine Vielzahl von Substanzen und schützt das Gehirn somit an der Blut-Hirn-Schranke vor potentiell toxischen Agentien. Allerdings werden auch zahlreiche Antiepileptika von Pgp transportiert. Durch die anfallsinduzierte Überexpression von Pgp verändert sich dieser prinzipielle Schutzmechanismus folglich dahingehend, dass Antiepileptika ihren Wirkungsort nicht mehr erreichen. Dieses Phänomen ist die Grundlage der Multidrug-Transporter-Hypothese und erklärt das Ausbleiben des Behandlungserfolges therapieresistenter Epilepsien (LOSCHER u. POTSCHKA 2005a).

Zur Überwindung der transporterbasierten Pharmakoresistenz werden verschiedene Strategien verfolgt. Dazu zählen vor allem die Reduktion der MDR1 (Pgp) Genexpression, die Modulation von Pgp durch Inhibition sowie die Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Expression.

Zur Reduktion der MDR1-Genexpression verfolgt man derzeit die Strategie der RNA Interferenz (RNAi). Für die Wirkung der RNAi sind kleine siRNA (silenceRNA) Moleküle verantwortlich, die im Körper jedoch sehr schnell abgebaut werden. Aufgrund dieses schnellen Abbaus war die Reduktion der Pgp-Expression durch RNAi bislang nicht erfolgreich (MATSUI et al. 2005). Allerdings könnte zukünftig durch die Verpackung der siRNA in polyethylenglycolhaltige, kationische Liposomen die Stabilität der siRNA Moleküle verbessert werden (ZIMMERMANN et al. 2006). Dieses Vorgehen ist jedoch nicht frei von zahlreichen Risiken. Aufgrund von Sequenzübereinstimmungen können die siRNA-Moleküle nämlich an verschiedene Ziel-mRNAs binden. Man spricht von sogenannten „Off-Target-Effekten“ (LEUNG u. WHITTAKER 2005). Dadurch kam es bereits zur Beeinflussung der Interferon-Antwort von Säugern, der Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen und zu retrovirus-vermittelten Insertionsmutagenesen durch die gentherapeutische Behandlung (KARIKO et al. 2004; LEUNG u. WHITTAKER 2005).

Die Pgp-Inhibition mittels selektiver Pgp-Hemmer ist seit mehr als zwei Jahrzehnte das Ziel zahlreicher, vor allem onkologischer Studien. Durch die Kombinationstherapie von Chemotherapeutika mit Pgp-Inhibitoren erhoffte man sich die Überwindung der transporterbasierten Pharmakoresistenz. Allerdings übt Pgp an allen Blut-Gewebe-Schranken eine Schutzfunktion aus. Durch die systemische Hemmung von Pgp durch Tariquidar kam es folglich zur systemischen Vergiftungen durch die Chemotherapeutika in den Probanden, weswegen letztlich alle Studien eingestellt worden sind (FOX u. BATES 2007). Hinzu kam, dass bei nur 4 von 17 pharmakoresistenten Patienten in klinischen Phase II Studien durch die Hemmung von Pgp mittels Tariquidar das Ansprechverhalten auf Chemotherapeutika verbessert werden konnte (PUSZTAI et al. 2005).

Auch in Modellen der therapieresistenten Epilepsie wurde mittels selektiver Pgp-Inhibition versucht, die Aufnahme von Antiepileptika ins Gehirn zu verbessern. Van Vliet et al. (2006) gelang es durch die Kombination von Tariquidar und Phenytoin das Gehirn-Plasma Verhältnis von Phenytoin zu verbessern. Das führte zu einer Beeinflussung der Anfallsdauer, der Anfallsschwere und der Anfallsfrequenz. Trotz dieses Therapieerfolges ließ sich jedoch auch unter der maximal tolerablen Dosis von Phenytoin keine Anfallsfreiheit erreichen (VAN VLIET et al. 2006). Außerdem verschlechterte sich die Wirkung der Therapie unter der Behandlung. Das lag vermutlich an der Induktion der Cytochrom-P450 Isozyme und der daraus resultierenden Veränderungen hinsichtlich der Metabolisierung von Tariquidar und/oder Phenytoin. Zudem wurde eine kompensatorische Hochregulation anderer Multidrug-Transporter beobachtet, wodurch die Vorteile einer spezifischen Inhibition weiter minimiert wurde (VAN VLIET et al. 2006). Es darf außerdem nicht vergessen werden, dass die Inhibition von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke zu einer dramatischen Toxizitätszunahme verschiedener Stoffe führt, die durch ihre hohe Affinität zu Pgp die Blut-Hirn-Schranke normalerweise nicht durchdringen können (SCHINKEL 1999). Aufgrund ihrer weitreichenden Risiken können Pgp-Inhibitoren bislang therapeutisch nicht eingesetzt werden. Dies belegen zahlreiche klinische Studien mit Verapamil, Quinidine, Cyclosporin, Valspodar, Elacridar und Tariquidar, die sämtlich aus den genannten Gründen erfolglos geblieben sind (DEEKEN u. LOSCHER 2007). In Folge dessen liegen bis heute weder bei der EMEA noch bei der FDA Zulassungsanträge für selektive Pgp-Inhibitoren vor.

Die im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Strategie zur Prävention der anfallsinduzierten Pgp-Expression mittels COX-2-Inhibition stellt demzufolge derzeit eine vielversprechende Alternative dar, die Transporter basierte Pharmakoresistenz zu verhindern. Erstmals war es uns zusammen mit unseren Kooperationspartnern gelungen, an der Blut-Hirn-Schranke einen Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Weg in vitro zu identifizieren, der zu einer verstärkten Pgp-Expression führt. Neben der COX-2-Inhibition besteht folglich auch durch die selektive Hemmung des NMDA-Rezeptors mittels MK-801 die Möglichkeit, die Pgp-Expression zu beeinflussen (BANKSTAHL et al. 2008; BAUER et al. 2008). Die zentrale Hemmung des NMDA-Rezeptors hat in vivo allerdings sehr stark dämpfende Wirkungen, woraus ein sehr hohes Nebenwirkungspotential resultiert (FREY 2002). Neben MK-801 war es allerdings auch mittels des COX-unselektiven nichtsteroidalen Antiphlogistikums (NSAID) Indomethazin gelungen, die Pgp-Expression in vivo zu inhibieren (BAUER et al. 2008). Doch verursachen NSAIDS durch ihre zusätzliche Hemmung auf die COX-1 umfangreiche Nebenwirkungen, wie gastrointestinale Läsionen und Störungen in der Plättchenaggregation (HINZ et al. 2007). Es wurde daher geprüft, inwieweit die Inhibition der COX-2 eine Möglichkeit darstellt, der Überexpression von Pgp therapeutisch zu begegnen. Dazu wurde durch selektive COX-2-Hemmung die Überexpression von Pgp an isolierten Gehirndothelzellen der Ratte verhindert (BAUER et al. 2008). Um dieses Erkenntnis in vivo zu verifizieren, wurde in einem Vorversuch mittels des fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modells die SE-induzierte Pgp-Überexpression in Gehirndothelzellen nachgewiesen. Im Folgenden konnte dann durch die gleichzeitige Behandlung mit Celecoxib oder NS-398 der Einfluss der selektiven COX-2-Hemmung auf die Pgp-Expression getestet werden. Dabei finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass der Einsatz von COX-2-Inhibitoren in unterschiedlichen Anfallsmodellen sowohl pro- als auch antikonvulsive Effekte zeigt (BAIK et al. 1999; SHAFIQ et al. 2003). Chen und Bazan (2004) berichteten von einem Einfluss der COX-2 auf die Membranerregbarkeit und Membranstabilität der Pyramidenzellen im Hippocampus, die dieses Phänomen erklären könnte. Je nach Art des Einflusses der selektiven COX-2-Hemmung auf die Membranerregbarkeit wären sowohl pro- als auch antikonvulsive Effekte erklärbar. In unseren Versuchen mit Celecoxib und NS-398 wurde kein Einfluss der selektiven COX-2-Hemmung auf die Anfallsauslösung und Anfallsschwere festgestellt. Die mit Celecoxib behandelten Tiere benötigten sogar signifikant weniger Diazepam zur Unterbrechung des Status

epilepticus als die Vergleichsgruppe, was antikonvulsive Effekte wahrscheinlicher erscheinen lässt. In den Versuchen mit NS-398 waren diese Effekte allerdings nicht feststellbar. Die Daten decken sich mit den Ansichten von Baran et al. (1994) und Gobbo und O'Mara (2004), die ebenfalls keine Verstärkung der selektiven COX-2-Hemmung auf das Anfallsgeschehen feststellen konnten (BARAN et al. 1994; GOBBO u. O'MARA 2004). Ebenso konnte durch die selektive COX-2-Hemmung keine Erhöhung der Mortalität festgestellt werden, wie sie von Baik et al. (1999) berichtet worden ist (BAIK et al. 1999).

Um die benötigte Anzahl von Tieren zu erreichen, setzten sich die NS-398 Versuche zur Messung der Pgp-Expression aus drei Einzelversuchen zusammen. Die immunhistologische Färbung der Schnitte des NS-398 Versuchs war zunächst ergebnislos geblieben, da signifikante Unterschiede in der Pgp-Expression zwischen der ersten und den letzten beiden Versuchsgruppen aufgetreten sind. Da es sich um zwei Tierchargen handelte, sind dafür wahrscheinlich genetische Unterschiede zwischen den Chargen verantwortlich. Um diese auszugleichen wurde zum Nachweis der SE-induzierte Pgp-Überexpression im Rahmen dieser Arbeit die Pgp-Färbung mittels des monoclonalen C-219 Antikörpers reetabliert. Bei dem Antikörper C-219 handelt es sich um ein Epitop des zuvor verwendeten MDR1-Antikörpers.

In beiden Fällen wurde ein Computer basiertes Bildanalysesystem zur Messung der immunhistologisch markierten Fläche und der optischen Dichte (OD) herangezogen (VOLK et al. 2004). Signifikante Hinweise auf Veränderungen der Pgp-Expression können sich hinsichtlich der immunhistologisch markierten Flächenausdehnung und/oder hinsichtlich der optischen Dichte der markierten Fläche ergeben. Eine Vergrößerung der Pgp-markierten Fläche bedeutet eine Zunahme der Pgp-Expression in Endothelzellen, deren Pgp-Expression unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Eine Zunahme der optischen Dichte der markierten Fläche bedeutet eine Verstärkung des Pgp-Signals und somit einer Zunahme der Pgp-Expression an den nachweisbaren Lokalisationen.

Celecoxib

Um die Überexpression von Pgp darstellen zu können, wurden im Celecoxib-Versuch eine rostrale, eine intermediale und eine kaudale Region des Rattengehirns gefärbt und die corticale und hippocampale Pgp-Expression computergestützt ausgewertet. In der Pilocarpingruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme der Pgp-Expression in diesen Gehirnregionen. Die Behandlung mit Celecoxib verhinderte in den rostral untersuchten Regionen (2,3 mm posterior zu Bregma) sowie im kaudalen Cortex (5,8 mm posterior zu Bregma) die anfallsinduzierte Induktion der endothelialen Pgp-Expression. Aufgrund der sehr hohen Sensitivität der Färbung ist jedoch eine vollständige Sättigung der Färbeintensität aufgetreten, weswegen in der optischen Dichte keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden konnte. Dennoch belegen diese Daten eindeutig, dass durch die selektive COX-2-Hemmung mittels Celecoxib auch in vivo die Pgp-Überexpression verhindert werden kann.

NS-398

In allen vermessenen Anteilen des Hippocampus konnte durch die Behandlung mit NS-398 die anfallsinduzierte Pgp-Expression beeinflusst werden. Während jedoch die statusinduzierte Vergrößerung der Pgp-markierten Fläche unbeeinflusst blieb, verhinderte die Behandlung mit dem COX-2-Hemmstoff NS-398 die anfallsinduzierte Induktion der Färbeintensität der Pgp-markierten Fläche. Das bedeutet, dass die Ausbreitung der Pgp-Expression nicht verhindert werden konnte, wohl aber deren Intensität. Daraus ergibt sich auch durch NS-398 ein wirkungsvoller Schutz vor der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression.

Sowohl Celecoxib als auch NS-398 beeinflussen folglich die Pgp-Überexpression. Unterschiedliche Wirkungen der verschiedenen COX-2-Hemmstoffe wie die Wirkung auf die Membranstabilität könnten die unterschiedliche Beeinflussung von Pgp an den Endothelzellen der Ratte zwischen Celecoxib und NS-398 erklären. Vergleichsdaten zwischen Celecoxib und NS-398, die dazu näheren Aufschluss bringen könnten, liegen derzeit jedoch nicht vor.

Das Kontrollniveau der Pgp-Expression wurde in beiden Fällen jedoch nicht unterschritten. Die selektive COX-2-Hemmung scheint also die basale Pgp-Expression nicht zu beeinflussen. Daraus resultiert die Vermutung, dass die COX-2-

Hemmung die schützende Funktion von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke und folglich auch an den anderen Blut-Gewebe-Schranken nicht beeinflusst. Dies steht auch im Einklang mit den im Rahmen von früheren Arbeiten gewonnen in vitro Daten.

6.2 Die chronische Therapie mit Celecoxib

Auch wenn in unserer Untersuchung die chronische Therapie mit Celecoxib keine pathologischen Veränderungen induziert hat, sind verschiedene Risiken der selektiven COX-2-Hemmung bekannt. Ursprünglich war die Entwicklung selektiver COX-2-Hemmstoffe auf der Hypothese begründet worden, dass die COX-2 die Quelle des entzündungsvermittelnden PGE_2 und PGI_2 sei, wohingegen COX-1 die gleichen Prostaglandine im Magenepithel zur Zytoprotektion synthetisiere (FITZGERALD 2004). Man ging davon aus, dass durch die gleichzeitige Hemmung der COX-1 und COX-2 vor allem die COX-1 für die Nebenwirkungen der NSAIDs verantwortlich sei, was die pharmazeutische Industrie zur Entwicklung selektiver COX-2-Hemmstoffe veranlasste (HINZ u. BRUNE 2002; FITZGERALD 2004; HINZ et al. 2007). Diese Entwicklung führte letztendlich zur Zulassung von Celecoxib, Rofecoxib und Valdecoxib. Die Zulassung von Lumiracoxib wurde angestrebt.

Rofecoxib war der erste COX-2-Hemmstoff, der 2004 wieder vom Markt genommen worden ist. Die bis zu vierfache Erhöhung der Inzidenz von Myokardinfarkten führte letztendlich zur Zurücknahme der meisten stark selektiven COX-2-Hemmstoffe. Celecoxib ist derzeit als einziger COX-2-Hemmstoff in den USA und der EU zugelassen (HINZ u. BRUNE 2002). Außer Celecoxib hatte auch der wirksamste COX-2-Hemmstoff Lumiracoxib keine Auswirkung auf eine Inzidenzerhöhung der Myokardinfarkte (TOPOL u. FALK 2004). Lumiracoxib ist allerdings stark lebertoxisch. Die australische Zulassungsbehörde brach daher Ende 2007 sämtliche klinische Studien ab, nachdem es zu acht Fällen von schweren Leberschäden gekommen war. Die Aufnahme von mehr als 200mg täglich machte bei zwei Patienten eine Lebertransplantation erforderlich bei zwei weiteren Patienten war die Anwendung letal (HINZ et al. 2007). Auch die Hypothese, dass die COX-2 überwiegend pathologische und die COX-1 überwiegend physiologische Vorgänge induziere, musste widerrufen werden. So ist das COX-Syntheseprodukt PGI_2 in Endothelzellen für die Inhibition der Plättchenaggregation, die Vasodilatation und die Proliferation von Gefäßmuskelzellen verantwortlich (FITZGERALD 2004). Lange war man davon ausgegangen, dass die COX-1 als einzige COX-Form in Endothelzellen

auch für die Produktion von PGI_2 verantwortlich sei. Zuerst wurde dann widerlegt, dass nur die COX-1 in Endothelzellen vorkomme, später musste man einsehen, dass PGI_2 in den Endothelzellen tatsächlich vornehmlich von der COX-2 synthetisiert wird (FITZGERALD 2004). Die kardiovaskulären Nebenwirkungen können folglich auf die Hemmung der COX-2 in den Endothelzellen zurückgeführt werden. Aufgrund dieser Veränderungen wurde auch mit Celecoxib eine Langzeitstudie durchgeführt. In der sogenannten CLASS (Celecoxib Long Term Arthritis Safety Study) - Studie wurde Celecoxib mit Ibuprofen und Diclofenac verglichen. Im Zwischenbericht zeigte Celecoxib ein verbessertes Profil gastrointestinaler Nebenwirkungen gegenüber den NSAIDs und keine kardiovaskulären Nebenwirkungen. Im Abschlussbericht hingegen zeigte Celecoxib hinsichtlich der gastrointestinalen Nebenwirkungen keinen Vorteil gegenüber NSAIDs und auch auf ein verstärktes Risiko für kardiovaskuläre Nebenwirkungen wurde hingewiesen. Seitdem geht man davon aus, dass das Herzkreislaufisiko mit der Dosis und der Behandlungsdauer ansteigen kann (FITZGERALD 2004). Das ist auch der Grund dafür, dass Celecoxib in den ersten vier Behandlungswochen dieser Studie keine pathologisch sichtbaren Veränderungen zeigte. Dadurch kann Celecoxib in den Tiermodellen der pharmakoresistenten Epilepsie wahrscheinlich problemlos eingesetzt werden. Sollten sich an diese Studien jedoch klinische Versuche anschließen, wird aufgrund der hohen Risiken der Einsatz von Celecoxib an Herz-Kreislauf-Risiko-Patienten nicht möglich sein. Und auch bei herzgesunden Patienten wird der Einsatz von Celecoxib eine genaue Überwachung der Kreislaufwerte erfordern.

6.3 Die Verhinderung der hippocampalen PGE_2 -Synthese durch NS-398

PGE_2 , das Syntheseprodukt der COX-2 ist im Gehirn ein Vermittler verschiedener physiologischer und pathologischer Abläufe. Physiologisch ist PGE_2 an der Membranerregbarkeit und Membranstabilität der Synapsen im Hippocampus beteiligt (CHEN u. BAZAN 2005). Pathologisch vermittelt PGE_2 neurotoxische Vorgänge bei Epilepsie und verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen (KIM et al. 2001; MANABE et al. 2004).

Aufgrund der physiologischen Beteiligung von PGE_2 an der Membranerregbarkeit und Membranstabilität wurde sowohl von pro- als auch antikonvulsiven Wirkungen der selektiven COX-2-Hemmung berichtet. Die COX-2 vermittelt ihre Wirkung durch die Synthese verschiedener Prostaglandine. Die benannten Einflüsse resultieren aus

der Aktivität des PGE₂, wobei auch nachgewiesen werden konnte, dass die COX-2 im Gehirn an der Synthese von PGD₂ und PGF_{2α} nicht beteiligt ist (CHEN u. BAZAN 2005). Chen und Bazan (2005) berichteten außerdem, dass die Abwesenheit von PGE₂ zu einer Reduktion der Membranerregbarkeit führe. Dahingegen vermittelt die Anwesenheit von PGE₂ eine Zunahme der Spike-Frequenz in isolierten Hippocampi. Ein antikonvulsiver Effekt der COX-2-Hemmung erscheint demzufolge wahrscheinlicher als ein prokonvulsiver Effekt, wie er von Baik (1999) berichtet worden ist. In unseren Untersuchungen zeigte sich jedoch weder ein pro- noch ein deutlicher antikonvulsiver Effekt. Durch unsere Analyse der anfallsinduzierten, hippocampalen PGE₂-Sekretion kann dieses Phänomen erklärt werden. Die selektive COX-2-Hemmung vermindert offensichtlich nur die anfallsinduzierte zusätzliche COX-2-Aktivität, die letztendlich auch zur Pgp-Überexpression führt. Die basale und somit physiologische Synthese von PGE₂ bleibt hingegen erhalten. Kim et al. (2001) hatte feststellen können, dass die COX-1 an der basalen PGE₂ Synthese beteiligt ist, weswegen folglich die Hemmung beider Isoformen der COX durch NSAIDs die Synthese des PGE₂ vollständig verhindert und somit unerwünschte Nebeneffekte induziert (KIM et al. 2001).

Pathologische Prozesse verursachen häufig eine Zunahme der COX-2-Aktivität und -Expression. Die cerebrale COX-2-Aktivität und -Expression wird durch Ischämie, degenerative Erkrankungen und Anfälle beeinflusst (NOGAWA et al. 1997; PASINETTI u. AISEN 1998; HO et al. 1999). Takemiya et al. (2006) konnte zeigen, dass die PGE₂-Konzentration in Wildtyp-Mäusen 24 Stunden nach einem Anfallsgeschehen ihren Höhepunkt erreicht. Auch in unserer Studie lag die hippocampale PGE₂-Konzentration 24 Stunden nach einem Anfallsgeschehen signifikant über dem Kontrollniveau. Während bei Takemiya et al. (2006) COX-2-knockout Mäuse keine vermehrte PGE₂-Synthese durch die Anfallsinduktion zeigten, konnte in unseren Untersuchungen mittels eines selektiven COX-2-Inhibitors die PGE₂-Synthese auf Kontrollniveau gehalten werden. Dies belegt, dass eine gesteigerte Aktivität und/oder Expression von COX-2 im Anfallsgeschehen für die Synthese des PGE₂ verantwortlich ist.

Im Anfallsgeschehen kommt es zu einer massiven Ausschüttung von Glutamat (STRAUSS u. MARINI 2002). Die daraus resultierende Aktivierung des NMDA-Rezeptors führt letztendlich zur Schädigung und dem Verlust von Neuronen

(GARDONI u. DI LUCA 2006). Wir konnten im fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell zeigen, dass die gesteigerte COX-2-Aktivität zu einer vermehrten Synthese von PGE₂ führt. PGE₂ vermittelt durch die Stimulation verschiedener PGE₂-Rezeptoren neurotoxische Effekte (MCCULLOUGH et al. 2004). In unserer Studie reduzierte die Behandlung mit NS-398 die hippocampale Synthese von PGE₂ auf Kontrollniveau. Neben den Einflüssen auf die Pgp-Expression resultiert daraus zusätzlich eine neuroprotektive Wirkung selektiver COX-2-Hemmstoffe (KAWAGUCHI et al. 2005; TAKEMIYA et al. 2006). Da es durch die Stimulation des NMDA-Rezeptors zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen kommt und nicht durch die COX-2-Aktivität, hat die Hemmung der COX-2 allerdings keinen Einfluss auf die durch die Sauerstoffradikalen verursachten Zellschäden (PEPICELLI et al. 2005).

6.4 Schlussbetrachtung

Die Überexpression von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke wird mit der Pharmakoresistenz von Epilepsien in Zusammenhang gebracht. Ziel der Arbeit war es, mittels selektiver COX-2-Hemmung eine Strategie zur Prävention der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression zu entwickeln. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die Überexpression von Pgp durch einen Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Weg vermittelt wird. In diesen Studien war es in vitro gelungen, die glutamatinduzierte Pgp-Überexpression durch eine selektive COX-2-Hemmung zu verhindern. Die vorliegende Arbeit hat diese Ergebnisse in vivo verifiziert. Es ist gelungen, die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression durch den Einsatz selektiver COX-2-Hemmstoffe im fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell zu verhindern. Sowohl Celecoxib als auch NS-398 waren in der Lage, die Pgp-Expression im Anfallsgeschehen auf Kontrollniveau zu halten. Daraus ergibt sich erstmals die Möglichkeit, einen therapeutischen Einfluss auf das multifaktorielle Geschehen der Pharmakoresistenz zu nehmen. Aufgrund zahlreicher Risiken der selektiven COX-2-Hemmung ist Celecoxib derzeit als einziger Wirkstoff weltweit zugelassen. Unsere Studien legen den Schluss nahe, dass sich Celecoxib grundsätzlich zum Einsatz in chronischen Versuchsmodellen eignet. Weiterführende Untersuchungen zeigen allerdings auch, dass die Gefahr der durch Celecoxib verursachten Nebenwirkungen mit der Behandlungsdauer und -dosis zunehmen kann. Sofern aus den chronischen Versuchsmodellen klinische Studien hervorgehen, wird daher eine genaue Überwachung der Patienten zwingend erforderlich sein. Da kreislaufflabile Patienten

und Patienten mit gastrointestinalen Symptomen wahrscheinlich nicht mit Celecoxib behandelt werden können, werden weiterführende Studien durchgeführt, um alternative Zielstrukturen zu identifizieren, die an der anfallsassoziierten Induktion von Pgp beteiligt sind.

7 Zusammenfassung

Epilepsie ist eine chronische neurologische Erkrankung mit einer hohen Prävalenz bei Mensch und Tier. Bis heute erfordert die Therapie der Epilepsie bei den meisten Patienten eine lebenslange Behandlung mit antikonvulsiven Wirkstoffen. Bei mehr als 30% der Epilepsiepatienten kann durch die Pharmakotherapie keine zufriedenstellende Kontrolle der Anfälle erreicht werden. Man spricht in diesem Falle von Pharmakoresistenz.

Die Aufnahme von Antiepileptika ins Gehirn wird an der Blut-Hirn-Schranke unter anderem von sogenannten Multi-Drug-Transportern reguliert. Das phosphorylierte Glycoprotein (Pgp) ist der bekannteste und am besten untersuchte Multi-Drug-Transporter. Durch seine Lokalisation in der apikalen Membran von Endothelzellen, beschränkt Pgp die Passage verschiedener Antiepileptika ins Gehirn. Daher wird angenommen, dass eine Überexpression von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke den Zugang von Antiepileptika zu ihren Zielstrukturen im epileptischen Gehirn vermindert und dadurch für das Ausbleiben des Behandlungserfolges verantwortlich ist.

Aktuelle Forschungsvorhaben versuchen die Mechanismen zu klären, die die Überexpression von Pgp im Gehirn vermitteln. Dadurch sollen Zielstrukturen identifiziert werden, um die Pgp-Überexpression nach einem Anfallsgeschehen zu verhindern und somit der Ausbildung einer Pharmakoresistenz vorzubeugen. Es konnte schon gezeigt werden, dass die anfallsinduzierte Freisetzung von Glutamat über den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor die Pgp-Expression induziert. Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist als ein nachgeordneter Effektor identifiziert worden, der die Induktion von Pgp vermittelt. Basierend auf diesen Daten war angenommen worden, dass die selektive COX-2-Inhibition eine Strategie darstellen könnte, die Pgp-Überexpression im epileptischen Gehirn zu verhindern.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde der Effekt der COX-2-Inhibition in einem Status epilepticus Modell an weiblichen Wistar-Ratten getestet. Der Status epilepticus wurde durch die wiederholte Gabe des Chemokonvulsivums Pilocarpin induziert. Die daraus resultierende Anfallsaktivität führte zu einer deutlichen Pgp-Induktion. Diese wurde im Hippocampus und im parietalen Cortex immunhistochemisch nachgewiesen. Die mehrtägige Behandlung mit dem COX-2-Hemmstoff Celecoxib verhinderte diese Induktion und hielt die Ausdehnung der Pgp-markierten Fläche auf Kontrollniveau.

Die Behandlung mit dem COX-2-Hemmstoff NS-398 führte zu einer Beeinflussung der Färbeintensität der Pgp-markierten Fläche verhinderte dadurch ebenfalls die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression. Über den Nachweis des COX-2-Syntheseproduktes PGE_2 konnte außerdem gezeigt werden, dass der Status epilepticus eine Aktivitätssteigerung der COX-2 im Gehirn verursacht. Die NS-398-Behandlung inhibierte die Synthesesteigerung des neurotoxischen PGE_2 und hielt die COX-2-Aktivität auf Kontrollniveau.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die selektive COX-2-Inhibition eine mögliche Strategie darstellt, die Pgp-Expression im epileptischen Gehirn zu regulieren. Die subchronische Applikation mit einem COX-2-Hemmstoff wird dabei von den Ratten gut toleriert. Basierend auf diesen Ergebnissen werden weiterführende Studien belegen, ob die Applikation von Celecoxib die Pharmakoresistenz in chronischen Epilepsie-Modellen verhindern kann. Diese Studien werden zeigen, ob die selektive COX-2-Inhibition eine zukünftige Strategie darstellt, die Transporter basierte Pharmakoresistenz von Epilepsien zu überwinden.

8 Summary

Guido Zibell

PREVENTION OF SEIZURE-INDUCED UPREGULATION OF PGP-EXPRESSION BY COX-2 INHIBITION

Epilepsy is a chronic neurological disease with a high prevalence in humans as well as some animal species. Up to now the therapy of epilepsy is limited to a life-long treatment with antiepileptic drugs. In more than 30% of all patients with epilepsy, however, pharmacotherapy does not result in an adequate seizure control, i.e. the disease proves to be pharmacoresistant.

The uptake of anti-epileptic drugs (AED) into the brain is regulated by Multidrug-Transporters (MDT) which are localized at the blood-brain-barrier. The phosphorylated glycoprotein (Pgp) is the most common and best studied MDT. With its localization in the apical membrane of endothelial cells Pgp restricts the passage of different AEDs into the brain. Thus, it is hypothesized that seizure-induced overexpression of Pgp at the blood brain barrier can restrict access of antiepileptic drugs to their targets sites in the epileptic brain and can thereby contribute to therapeutic failure.

Current research projects try to elucidate the mechanisms mediating Pgp overexpression in the epileptic brain. The aim is to identify targets which might help to thwart Pgp overexpression following seizure activity to prevent pharmacoresistance. It was recently demonstrated that a seizure-associated release of glutamate signals via N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor of endothelial cells to drive Pgp-Expression. Cyclooxygenase-2 (COX-2) was identified as one of the downstream effectors that mediates induction of Pgp. Based on these data it has been hypothesized that selective COX-2 inhibition might render a strategy to prevent Pgp overexpression in the epileptic brain.

To prove this hypothesis the effect of COX-2 inhibition on Pgp-Expression was determined in a status epilepticus (SE) model using female wistar rats. SE was induced by repeated administration of the chemoconvulsant pilocarpine and resulted in a strong induction of Pgp. The induction of Pgp was detected in the hippocampus and parietal cortex by immunohistochemistry. The selective COX-2 inhibitor Celecoxib inhibited the seizure-induced increase of Pgp-Expression and decreased the

extension of the Pgp-labeled area to control level. Treatment with the COX-2 inhibitor NS-398 prevented an increase of the intensity of the Pgp-labeled area. Thus both Celecoxib and NS-398 inhibited the seizure-induced Pgp overexpression. By evaluation of the COX-2 synthesis product PGE₂ it was shown that seizures induce COX-2 activity. Treatment with NS-398 inhibited the increased production of PGE₂ and remained COX-2 activity at control level.

These results demonstrate that selective COX-2 inhibition is a suitable strategy to control Pgp-Expression levels in the epileptic brain. Subchronic administration of the COX-2 inhibitors proved to be well tolerated in rats. Further studies using chronic models of intractable epilepsy are however needed to univocally substantiate the suitability of selective COX-2 inhibition as a strategy to overcome transporter-mediated pharmacoresistance in epilepsies.

9 Literaturverzeichnis

ARONICA, E., J. A. GORTER, G. H. JANSEN, C. W. VAN VEELEN, P. C. VAN RIJEN, S. LEENSTRA, M. RAMKEMA, G. L. SCHEFFER, R. J. SCHEPER u. D. TROOST (2003):

Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors.

Neuroscience 118, 417-429

BAIK, E. J., E. J. KIM, S. H. LEE u. C. MOON (1999):

Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus.

Brain Res 843, 118-129

BANKSTAHL, J. P., K. HOFFMANN, K. BETHMANN u. W. LOSCHER (2008):

Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain.

Neuropharmacology 54, 1006-1016

BARAN, H., K. VASS, H. LASSMANN u. O. HORNYKIEWICZ (1994):

The cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor BW755C protects rats against kainic acid-induced seizures and neurotoxicity.

Brain Res 646, 201-206

BARRAND, M. A., K. J. ROBERTSON u. S. F. VON WEIKERSTHAL (1995):

Comparisons of P-glycoprotein expression in isolated rat brain microvessels and in primary cultures of endothelial cells derived from microvasculature of rat brain, epididymal fat pad and from aorta.

FEBS Lett 374, 179-183

BATES, S. F., C. CHEN, R. ROBEY, M. KANG, W. D. FIGG u. T. FOJO (2002):

Reversal of multidrug resistance: lessons from clinical oncology.

Novartis Found Symp 243, 83-96; discussion 96-102, 180-105

BAUER, B., A. M. HARTZ, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2005):

Modulation of p-glycoprotein transport function at the blood-brain barrier.

Exp Biol Med (Maywood) 230, 118-127

BAUER, B., A. M. HARTZ u. D. S. MILLER (2007):

Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier.

Mol Pharmacol 71, 667-675

BAUER, B., A. M. HARTZ, A. PEKCEC, K. TOELLNER, D. S. MILLER u. H. POTSCHKA (2008):

Seizure-Induced Upregulation of P-glycoprotein at the Blood-Brain Barrier through Glutamate and COX-2 Signaling.

Mol Pharmacol

BAZAN, N. G. u. R. J. FLOWER (2002):

Medicine: lipid signals in pain control.

Nature 420, 135-138

BECK, H., R. STEFFENS, U. HEINEMANN u. C. E. ELGER (1999):

Ca(2+)-dependent inactivation of high-threshold Ca(2+) currents in hippocampal granule cells of patients with chronic temporal lobe epilepsy.

J Neurophysiol 82, 946-954

BEGLEY, D. J. (2004):

ABC transporters and the blood-brain barrier.

Curr Pharm Des 10, 1295-1312

BOOTE, D. J., I. F. DENNIS, P. R. TWENTYMAN, R. J. OSBORNE, C. LABURTE, S. HENSEL, J. F. SMYTH, M. H. BRAMPTON u. N. M. BLEEHEN (1996):

Phase I study of etoposide with SDZ PSC 833 as a modulator of multidrug resistance in patients with cancer.

J Clin Oncol 14, 610-618

BRANDT, C., K. BETHMANN, A. M. GASTENS u. W. LOSCHER (2006):

The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy.

Neurobiol Dis 24, 202-211

BREDER, C. D., D. DEWITT u. R. P. KRAIG (1995):

Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain.

J Comp Neurol 355, 296-315

BROWNE, T. R. u. G. L. HOLMES (2001):

Epilepsy.

N Engl J Med 344, 1145-1151

CAGGIANO, A. O., C. D. BREDER u. R. P. KRAIG (1996):

Long-term elevation of cyclooxygenase-2, but not lipoxygenase, in regions synaptically distant from spreading depression.

J Comp Neurol 376, 447-462

CHEN, C. u. N. G. BAZAN (2005):

Endogenous PGE₂ regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons.

J Neurophysiol 93, 929-941

CHOI, D. W. (1998):

Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.

Neuron 8, 623–634

CHU, K., S. W. JEONG, K. H. JUNG, S. Y. HAN, S. T. LEE, M. KIM u. J. K. ROH (2004):

Celecoxib induces functional recovery after intracerebral hemorrhage with reduction of brain edema and perihematoma cell death.

J Cereb Blood Flow Metab 24, 926-933

COLLACO-MORAES, Y., B. ASPEY, M. HARRISON u. J. DE BELLEROCHE (1996):

Cyclo-oxygenase-2 messenger RNA induction in focal cerebral ischemia.

J Cereb Blood Flow Metab 16, 1366-1372

CORDON-CARDO, C., J. P. O'BRIEN, D. CASALS, L. RITTMAN-GRAUER, J. L. BIEDLER, M. R. MELAMED u. J. R. BERTINO (1989):

Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites.

Proc Natl Acad Sci U S A 86, 695-698

CORNFORD, E. M. u. S. HYMAN (1999):

Blood-brain barrier permeability to small and large molecules.

Adv Drug Deliv Rev 36, 145-163

COYLE, J. T. P., P. (1993):

Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders.

Science 262, 689–695

DANO, K. (1973):

Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.

Biochim Biophys Acta 323, 466-483

DASH, P. K., S. A. MACH u. A. N. MOORE (2000):

Regional expression and role of cyclooxygenase-2 following experimental traumatic brain injury.

J Neurotrauma 17, 69-81

DEEKEN, J. F. u. W. LOSCHER (2007):

The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses.

Clin Cancer Res 13, 1663-1674

DEMEULE, M., A. REGINA, J. JODOIN, A. LAPLANTE, C. DAGENAIS, F. BERTHELET, A. MOGHRABI u. R. BELIVEAU (2002):

Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier.

Vascul Pharmacol 38, 339-348

DESJARDINS, P., A. SAUVAGEAU, A. BOUTHILLIER, D. NAVARRO, A. S. HAZELL, C. ROSE u. R. F. BUTTERWORTH (2003):

Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis.

Neurochem Int 42, 299-303

EUCHENHOFER, C., C. MAIHOFNER, K. BRUNE, I. TEGEDER u. G. GEISSLINGER (1998):

Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS 398 and diclofenac on formalin-induced nociception in the rat.

Neurosci Lett 248, 25-28

FELIX, R. A. u. M. A. BARRAND (2002):

P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress.

J Neurochem 80, 64-72

FIRE, A., S. XU, M. K. MONTGOMERY, S. A. KOSTAS, S. E. DRIVER u. C. C. MELLO (1998):

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.

Nature 391, 806-811

FISCHER, V., A. RODRIGUEZ-GASCON, F. HEITZ, R. TYNES, C. HAUCK, D. COHEN u. A. E. VICKERS (1998):

The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A. Implications for drug-drug interactions and pharmacological activity of the main metabolite.

Drug Metab Dispos 26, 802-811

FITZGERALD, G. A. (2004):

Coxibs and cardiovascular disease.

N Engl J Med 351, 1709-1711

FITZGERALD, G. A. u. C. PATRONO (2001):

The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2.

N Engl J Med 345, 433-442

FLOWER, R. J. (2003):

The development of COX-2 inhibitors.

Nat Rev Drug Discov 2, 179-191

FOJO, T. u. S. BATES (2003):

Strategies for reversing drug resistance.

Oncogene 22, 7512-7523

FORD, J. M. u. W. N. HAIT (1990):

Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer.

Pharmacol Rev 42, 155-199

FOX, E. u. S. E. BATES (2007):

Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor.

Expert Rev Anticancer Ther 7, 447-459

FROMM, M. F. (2000):

P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs.

Int J Clin Pharmacol Ther 38, 69-74

FUTAKI, N., S. TAKAHASHI, M. YOKOYAMA, I. ARAI, S. HIGUCHI u. S. OTOMO (1994):

NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro.

Prostaglandins 47, 55-59

FUTAKI, N., K. YOSHIKAWA, Y. HAMASAKA, I. ARAI, S. HIGUCHI, H. IIZUKA u. S. OTOMO (1993):

NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions.

Gen Pharmacol 24, 105-110

GARDONI, F. u. M. DI LUCA (2006):

New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse.

Eur J Pharmacol 545, 2-10

GOBBO, O. L. u. S. M. O'MARA (2004):

Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration.

Neuroscience 125, 317-327

GRAFF, C. L. u. G. M. POLLACK (2004):

Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus.

Curr Drug Metab 5, 95-108

HARA, K., D. L. KONG, F. R. SHARP u. P. R. WEINSTEIN (1998):

Effect of selective inhibition of cyclooxygenase 2 on temporary focal cerebral ischemia in rats.

Neurosci Lett 256, 53-56

HARTZ, A. M., B. BAUER, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2004):

Rapid regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by endothelin-1.

Mol Pharmacol 66, 387-394

HARTZ, A. M., B. BAUER, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2006):

Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide.

Mol Pharmacol 69, 462-470

HAUSER, W. A. (1999):

Incidence and Prevalence, The Comprehensive CD-ROM (Engel J, Jr., Pedley AT eds), Lippincott Williams and Wilkins.

HAUSER, W. A., J. F. ANNEGERS u. L. T. KURLAND (1993):

Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984.

Epilepsia 34, 453-468

HEWETT, S. J., T. F. ULIASZ, A. S. VIDWANS u. J. A. HEWETT (2000):

Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture.

J Pharmacol Exp Ther 293, 417-425

HINZ, B. u. K. BRUNE (2002):

Cyclooxygenase-2--10 years later.

J Pharmacol Exp Ther 300, 367-375

HINZ, B., B. RENNER u. K. BRUNE (2007):

Drug insight: cyclo-oxygenase-2 inhibitors--a critical appraisal.

Nat Clin Pract Rheumatol 3, 552-560; quiz 551 p following 589

HO, L. u. E. J. KIM (2005):

Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease.

Clin Pharmacol Ther 78, 260-277

HO, L., C. PIERONI, D. WINGER, D. P. PUROHIT, P. S. AISEN u. G. M. PASINETTI (1999):

Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease.

J Neurosci Res 57, 295-303

HOLMES, G. L. (2002):

Seizure-induced neuronal injury: animal data.

Neurology 59, S3-6

JONES, P. M. u. A. M. GEORGE (2004):

The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research.

Cell Mol Life Sci 61, 682-699

JULIANO, R. L. u. V. LING (1976):

A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.

Biochim Biophys Acta 455, 152-162

KARIKO, K., P. BHUYAN, J. CAPODICI, H. NI, J. LUBINSKI, H. FRIEDMAN u. D. WEISSMAN (2004):

Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3.

Cells Tissues Organs 177, 132-138

KAWAGUCHI, K., R. W. HICKEY, M. E. ROSE, L. ZHU, J. CHEN u. S. H. GRAHAM (2005):

Cyclooxygenase-2 expression is induced in rat brain after kainate-induced seizures and promotes neuronal death in CA3 hippocampus.

Brain Res 1050, 130-137

KIM, E. J., J. E. LEE, K. J. KWON, S. H. LEE, C. H. MOON u. E. J. BAIK (2001):

Differential roles of cyclooxygenase isoforms after kainic acid-induced prostaglandin E(2) production and neurodegeneration in cortical and hippocampal cell cultures.

Brain Res 908, 1-9

KURUMBAIL, R. G., A. M. STEVENS, J. K. GIERSE, J. J. MCDONALD, R. A. STEGEMAN, J. Y. PAK, D. GILDEHAUS, J. M. MIYASHIRO, T. D. PENNING, K. SEIBERT, P. C. ISAKSON u. W. C. STALLINGS (1996):

Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents.

Nature 384, 644-648

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2002):

Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition?

Seizure 11, 77-84

KWAN, P. u. J. W. SANDER (2004):

The natural history of epilepsy: an epidemiological view.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 75, 1376-1381

KWAN, P., G. J. SILLS, E. BUTLER, T. W. GANT u. M. J. BRODIE (2003):

Differential expression of multidrug resistance genes in naive rat brain.

Neurosci Lett 339, 33-36

LECOUTEUR, R. A. u. G. CHILD (1989):

Clinical management of epilepsy of dogs and cats.

Probl Vet Med 1, 578-595

LEE, B., H. DZIEMA, K. H. LEE, Y. S. CHOI u. K. OBRIETAN (2007):

CRE-mediated transcription and COX-2-Expression in the pilocarpine model of status epilepticus.

Neurobiol Dis 25, 80-91

LEUNG, R. K. u. P. A. WHITTAKER (2005):

RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics.

Pharmacol Ther 107, 222-239

LITMAN, T., T. E. DRULEY, W. D. STEIN u. S. E. BATES (2001):

From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.

Cell Mol Life Sci 58, 931-959

LÖSCHER (1994):

Neue Antiepileptika - Ein Fortschritt für die Behandlung epileptischer Kleintiere?

Kleintierpraxis 39, 238-258

LOSCHER, W. (2003):

Pharmakologische Grundlagen zur Behandlung der Epilepsie bei Hund und Katze.

Prakt. Tierarzt 84, 574-586

LOSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002):

Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs.

J Pharmacol Exp Ther 301, 7-14

LOSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005a):

Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters.

Nat Rev Neurosci 6, 591-602

LOSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005b):

Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases.

Prog Neurobiol 76, 22-76

LUONG, C., A. MILLER, J. BARNETT, J. CHOW, C. RAMESHA u. M. F. BROWNER (1996):

Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2.

Nat Struct Biol 3, 927-933

MANABE, Y., J. ANRATHER, T. KAWANO, K. NIWA, P. ZHOU, M. E. ROSS u. C. IADECOLA (2004):

Prostanoids, not reactive oxygen species, mediate COX-2-dependent neurotoxicity.

Ann Neurol 55, 668-675

MARTIN, C., G. BERRIDGE, P. MISTRY, C. HIGGINS, P. CHARLTON u. R. CALLAGHAN (1999):

The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein.

Br J Pharmacol 128, 403-411

MASFERRER, J. L., B. S. ZWEIFEL, K. SEIBERT u. P. NEEDLEMAN (1990):

Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice.

J Clin Invest 86, 1375-1379

MATSUI, Y., N. KOBAYASHI, M. NISHIKAWA u. Y. TAKAKURA (2005):

Sequence-specific suppression of mdr1a/1b expression in mice via RNA interference.

Pharm Res 22, 2091-2098

MATUTE, C., E. ALBERDI, G. IBARRETXE u. M. V. SANCHEZ-GOMEZ (2002):

Excitotoxicity in glial cells.

Eur J Pharmacol 447, 239-246

MAWATARI, K., Y. YASUI, K. SUGITANI, T. TAKADERA u. S. KATO (1996):

Reactive oxygen species involved in the glutamate toxicity of C6 glioma cells via xc antiporter system.

Neuroscience 73, 201-208

MCCULLOUGH, L., L. WU, N. HAUGHEY, X. LIANG, T. HAND, Q. WANG, R. M. BREYER u. K. ANDREASSON (2004):

Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia.

J Neurosci 24, 257-268

MEALEY, K. L., S. A. BENTJEN, J. M. GAY u. G. H. CANTOR (2001):

Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene.

Pharmacogenetics 11, 727-733

MEIER, P. J. u. B. STIEGER (2002):

Bile salt transporters.

Annu Rev Physiol 64, 635-661

MIRJANY, M., L. HO u. G. M. PASINETTI (2002):

Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity.

J Pharmacol Exp Ther 301, 494-500

MISTRY, P., A. J. STEWART, W. DANGERFIELD, S. OKIJI, C. LIDDLE, D. BOOTLE, J. A. PLUMB, D. TEMPLETON u. P. CHARLTON (2001):

In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576.

Cancer Res 61, 749-758

MITCHELL, J. A., S. LARKIN u. T. J. WILLIAMS (1995):

Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation.

Biochem Pharmacol 50, 1535-1542

NAKAYAMA, M., K. UCHIMURA, R. L. ZHU, T. NAGAYAMA, M. E. ROSE, R. A. STETLER, P. C. ISAKSON, J. CHEN u. S. H. GRAHAM (1998):

Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia.

Proc Natl Acad Sci U S A 95, 10954-10959

NELSON, O. L., E. CARSTEN, S. A. BENTJEN u. K. L. MEALEY (2003):

Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies.

J Vet Intern Med 17, 354-356

NOGAWA, S., F. ZHANG, M. E. ROSS u. C. IADECOLA (1997):

Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage.

J Neurosci 17, 2746-2755

NOVINA, C. D. u. P. A. SHARP (2004):

The RNAi revolution.

Nature 430, 161-164

O'BANION, M. K., V. D. WINN u. D. A. YOUNG (1992):

cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase.

Proc Natl Acad Sci U S A 89, 4888-4892

PARDRIDGE, W. M. (1999):

Blood-brain barrier biology and methodology.

J Neurovirol 5, 556-569

PASINETTI, G. M. u. P. S. AISEN (1998):

Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain.

Neuroscience 87, 319-324

PATEL, V. A., M. J. DUNN u. A. SOROKIN (2002):

Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2.

J Biol Chem 277, 38915-38920

PEPICELLI, O., E. FEDELE, M. BERARDI, M. RAITERI, G. LEVI, A. GRECO, M. A. AJMONE-CAT u. L. MINGHETTI (2005):

Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus.

J Neurochem 93, 1561-1567

POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. W. LOSCHER (2004):

Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats.

Neuroreport 15, 1657-1661

PUSZTAI, L., P. WAGNER, N. IBRAHIM, E. RIVERA, R. THERIAULT, D. BOOSER, F. W. SYMMANS, F. WONG, G. BLUMENSCHN, D. R. FLEMING, R. ROUZIER, G. BONIFACE u. G. N. HORTOBAGYI (2005):

Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma.

Cancer 104, 682-691

REGESTA, G. u. P. TANGANELLI (1999):

Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies.

Epilepsy Res 34, 109-122

RIEUX, C., R. CARNEY, D. LUPI, O. DKHISSI-BENYAHYA, K. JANSEN, N. CHOUNLAMOUNTRI, R. G. FOSTER u. H. M. COOPER (2002):

Analysis of immunohistochemical label of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus: comparison of different methods of quantification.

J Biol Rhythms 17, 121-136

SARKADI, B., L. HOMOLYA, G. SZAKACS u. A. VARADI (2006):

Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system.

Physiol Rev 86, 1179-1236

SCHINKEL, A. H. (1999):

P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.

Adv Drug Deliv Rev 36, 179-194

SCHINKEL, A. H., C. A. MOL, E. WAGENAAR, L. VAN DEEMTER, J. J. SMIT u. P. BORST (1995):

Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice.

Eur J Cancer 31A, 1295-1298

SEETHARAMAN, S., M. A. BARRAND, L. MASKELL u. R. J. SCHEPER (1998):

Multidrug resistance-related transport proteins in isolated human brain microvessels and in cells cultured from these isolates.

J Neurochem 70, 1151-1159

SEGAL, M. B. (2000):

The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid.

Cell Mol Neurobiol 20, 183-196

SHAFIQ, N., S. MALHOTRA u. P. PANDHI (2003):

Anticonvulsant action of celecoxib (alone and in combination with sub-threshold dose of phenytoin) in electroshock induced convulsion.

Methods Find Exp Clin Pharmacol 25, 87-90

SIMMONS, D. L., R. M. BOTTING, P. M. ROBERTSON, M. L. MADSEN u. J. R. VANE (1999):

Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs.

Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3275-3280

SPECTOR, R. (2000):

Drug transport in the mammalian central nervous system: multiple complex systems. A critical analysis and commentary.

Pharmacology 60, 58-73

STEFAN, H., F. H. LOPES DA SILVA, W. LOSCHER, D. SCHMIDT, E. PERUCCA, M. J. BRODIE, P. A. BOON, W. H. THEODORE u. S. L. MOSHE (2006):

Epileptogenesis and rational therapeutic strategies.

Acta Neurol Scand 113, 139-155

STEINLEIN, O. K. (2004):

Genetic mechanisms that underlie epilepsy.

Nat Rev Neurosci 5, 400-408

STRAUSS, K. I., M. F. BARBE, R. M. MARSHALL, R. RAGHUPATHI, S. MEHTA u. R. K. NARAYAN (2000):

Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat.

J Neurotrauma 17, 695-711

STRAUSS, K. I. u. A. M. MARINI (2002):

Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death.

J Neurotrauma 19, 627-638

TAKEMIYA, T., M. MAEHARA, K. MATSUMURA, S. YASUDA, H. SUGIURA u. K. YAMAGATA (2006):

Prostaglandin E2 produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region.

Neurosci Res 56, 103-110

TEGEDER, I., W. NEUPERT, H. GUHRING u. G. GEISSLINGER (2000):

Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs.

J Pharmacol Exp Ther 292, 1161-1168

TEODORI, E., S. DEI, C. MARTELLI, S. SCAPECCHI u. F. GUALTIERI (2006):

The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR).

Curr Drug Targets 7, 893-909

THOMAS, H. u. H. M. COLEY (2003):

Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein.

Cancer Control 10, 159-165

TISHLER, D. M., K. I. WEINBERG, D. R. HINTON, N. BARBARO, G. M. ANNETT u. C. RAFFEL (1995):

MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy.

Epilepsia 36, 1-6

TOPOL, E. J. u. G. W. FALK (2004):

A coxib a day won't keep the doctor away.

Lancet 364, 639-640

TSUJI, A. u. I. I. TAMAI (1999):

Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier.

Adv Drug Deliv Rev 36, 277-290

TU, B. u. N. G. BAZAN (2003):

Hippocampal kindling epileptogenesis upregulates neuronal cyclooxygenase-2 expression in neocortex.

Exp Neurol 179, 167-175

UPRICHARD, S. L. (2005):

The therapeutic potential of RNA interference.

FEBS Lett 579, 5996-6007

VAN VLIET, E. A., R. VAN SCHAIK, P. M. EDELBROEK, S. REDEKER, E. ARONICA, W. J. WADMAN, N. MARCHI, A. VEZZANI u. J. A. GORTER (2006):

Inhibition of the multidrug transporter P-glycoprotein improves seizure control in phenytoin-treated chronic epileptic rats.

Epilepsia 47, 672-680

VANE, J. R. (1971):

Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.

Nat New Biol 231, 232-235

VAUGHAN, C. W. (1998):

Enhancement of opioid inhibition of GABAergic synaptic transmission by cyclo-oxygenase inhibitors in rat periaqueductal grey neurones.

Br J Pharmacol 123, 1479-1481

VENTURA, C. A. G., I.; PAOLINO, D.; PISTARÀ, V.; CORSARO, A.; PUGLISI, G. (2005):

Preparation of celecoxib-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro permeation study.

European Journal of Medical Chemistry 40, 624-631

VERGUN, O., A. I. SOBOLEVSKY, M. V. YELSHANSKY, J. KEELAN, B. I. KHODOROV u. M. R. DUCHEN (2001):

Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture.

J Physiol 531, 147-163

VOLK, H. A., K. BURKHARDT, H. POTSCHKA, J. CHEN, A. BECKER u. W. LOSCHER (2004):

Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures.

Neuroscience 123, 751-759

VOLK, H. A., H. POTSCHKA u. W. LOSCHER (2005):

Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables.

J Histochem Cytochem 53, 517-531

VOUTSINOS-PORCHE, B., E. KONING, H. KAPLAN, A. FERRANDON, M. GUENOUNOU, A. NEHLIG u. J. MOTTE (2004):

Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.

Neurobiol Dis 17, 385-402

WALTON, M., E. SIRIMANNE, C. WILLIAMS, P. D. GLUCKMAN, J. KEELAN, M. D. MITCHELL u. M. DRAGUNOW (1997):

Prostaglandin H synthase-2 and cytosolic phospholipase A2 in the hypoxic-ischemic brain: role in neuronal death or survival?

Brain Res Mol Brain Res 50, 165-170

WANDEL, C., R. B. KIM, S. KAJIJI, P. GUENGERICH, G. R. WILKINSON u. A. J. WOOD (1999):

P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies.

Cancer Res 59, 3944-3948

WERNER, U., D. WERNER, A. PAHL, R. MUNDKOWSKI, M. GILLICH u. K. BRUNE (2002):

Investigation of the pharmacokinetics of celecoxib by liquid chromatography-mass spectrometry.

Biomed Chromatogr 16, 56-60

WILLINGALE, H. L., N. J. GARDINER, N. MCLYMONT, S. GIBLETT u. B. D. GRUBB (1997):
Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution
to the development of neuronal hyperexcitability.

Br J Pharmacol 122, 1593-1604

XIE, W. L., J. G. CHIPMAN, D. L. ROBERTSON, R. L. ERIKSON u. D. L. SIMMONS (1991):
Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by
mRNA splicing.

Proc Natl Acad Sci U S A 88, 2692-2696

YAGUE, E., C. F. HIGGINS u. S. RAGUZ (2004):

Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs
targeting MDR1.

Gene Ther 11, 1170-1174

ZHANG, Y., H. HAN, W. F. ELMQUIST u. D. W. MILLER (2000):

Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain
microvessel endothelial cells.

Brain Res 876, 148-153

ZHANG, Y., J. D. SCHUETZ, W. F. ELMQUIST u. D. W. MILLER (2004):

Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain
capillary endothelial cells.

J Pharmacol Exp Ther 311, 449-455

ZHU, H. J. u. G. Q. LIU (2004):

Glutamate up-regulates P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells
by an NMDA receptor-mediated mechanism.

Life Sci 75, 1313-1322

ZIMMERMANN, T. S., A. C. LEE, A. AKINC, B. BRAMLAGE, D. BUMCROT, M. N.
FEDORUK, J. HARBORTH, J. A. HEYES, L. B. JEFFS, M. JOHN, A. D. JUDGE, K. LAM, K.
MCCLINTOCK, L. V. NECHEV, L. R. PALMER, T. RACIE, I. ROHL, S. SEIFFERT, S.
SHANMUGAM, V. SOOD, J. SOUTSCHEK, I. TOUDJARSKA, A. J. WHEAT, E. YAWORSKI,
W. ZEDALIS, V. KOTELIANSKY, M. MANOHARAN, H. P. VORNLOCHER u. I.
MACLACHLAN (2006):

RNAi-mediated gene silencing in non-human primates.

Nature 441, 111-114

10 Lebenslauf

Tätigkeiten

08/2008 – heute	Regulatory Affairs Manager bei der Pfizer Pharma GmbH, Berlin
04/2007 -07/2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Ludwig-Maximilians-Universität München
02/2006 - 12/2006	Wissenschaftliche Hilfskraft im Fraunhofer Institut für Naturwissenschaftlich-Technische Trendanalysen, Euskirchen

Studium

28/03/2007	Approbation als Tierarzt
06/03/2007	Tierärztliche Prüfung, Gesamtnote: gut (2,16)
10/2001 - 03/2007	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Studium der Veterinärmedizin

Publikationen & Poster

Urolithiasis beim kleinen Wiederkäuer – Behandlungsmethoden und klinische Rekonvaleszenz, Dühlmeier R., G. Zibell, A. von Altrock, C. Roth, C. Schröder, K. Thies, M. Ganter, Tierärztliche Praxis Großtiere 2007 35 3: 175-182.

Brain penetration and anticonvulsant efficacy of intranasal phenobarbital in rats, Czapp M., J. Bankstahl, G. Zibell, and H. Potschka, Epilepsia 2008 Jul;49(7):1142-50.

Prevention of seizure-induced up-regulation of ppg at the blood-brain-barrier by COX-2 inhibition, Zibell G., B. Unkrüer, A. Pekcec, B. Bauer, A.M. Hartz, D.S. Miller, and H. Potschka, DGPT Mainz, März 2008

Praktika im In- und Ausland

- 05/06/2006 – 28/07/2006 NEIKER, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Department of Animal Health of NEIKER, Basque Institute for Agricultural Research and Development), Derio (Bizkaia), Spanien
- 13/03/2006 – 05/05/2006 Klinik für kleine Klauentiere, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- 30/01/2006 – 10/02/2006 Institut für Lebensmitteltoxikologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- 10/10/2005 – 20/01/2006 Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- 19/07/2004 – 16/08/2004 Klinik für Wiederkäuer, Klinisches Department für Nutztiere und Bestandsbetreuung, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich

Ehrenamtliche Tätigkeiten

- 10/2004 – 09/2005 Vorstand des AStA der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- 10/2003 – 09/2004 Chefredakteur der Hochschulzeitung Nexus
- 04/1994 – heute Mitglied und zwischenzeitlich aktiver Rettungshundeführer der Rettungshundestaffel Euskirchen-Voreifel e.V.

Schule und Zivildienst

- 08/2000 - 06/2001 Zivildienst im Bildungswerk Neues Lernen e.V., Köln
- 16/06/2000 Abitur, Gesamtnote: sehr gut (1,3)
- 08/1991 - 06/2000 Städtisches St. Michael Gymnasium Bad Münstereifel

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

Johann Wolfgang von Goethe

Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka danke ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte konstruktive Unterstützung meiner Arbeit. Von Beginn meines Praktikums bis zum Abfassen dieser Dissertation hat sie einen Lebensabschnitt entscheidend und zukunftsweisend mitgeprägt. In allen Labor- und Lebenslagen hatte sie stets ein offenes Ohr und hat mir und meinen Fähigkeiten ein uneingeschränktes Vertrauen entgegengebracht. Dafür danke ich ihr.

Anton danke ich für seine Anleitung zur experimentellen pharmakologischen und neurowissenschaftlichen Forschung, der wissenschaftlichen Diskussion und der Unterstützung bei der Abfassung sämtlicher Sachtexte. Unermüdlich hat er meine Arbeit unterstützt und darüber hinaus an zahllosen Abenden mein Leben auf unvergleichbare Weise bereichert. Daher danke ich ihm an dieser Stelle nicht nur als Betreuer – ich danke ihm vor allem als Freund.

Durch die Liebe und den Zuspruch von Katharina ist diese Arbeit letztendlich erst zustande gekommen und dafür danke ich ihr. Ohne zu Zögern ist sie mir zur Erfüllung meines beruflichen Werdegangs zuerst nach München und nun nach Berlin gefolgt. Wo immer es auch war, ist oder in Zukunft sein wird - dort wo Kathi ist, bin ich zu Hause.

Mein ganzes Leben hat mich meine Mutter mit ihrer Liebe, ihrer Unterstützung und ihrem Vertrauen begleitet. Um mir den Weg in meine Zukunft zu ebnen, hat sie dazu häufig Unvorstellbares geleistet. Mit ihrer Hilfe gelang es mir, sämtliche Etappen in meinem bisherigen Werdegang zu erreichen. Gerade an dieser Stelle lässt sich wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

Für ihren unerschütterlichen Glauben in mich und meine Fähigkeiten danke ich meiner Schwester Maria. Vor allem in Zeiten des Zweifels hat sie es verstanden, mich wieder auf die Beine zu stellen.

Petra hat durch Ihre Unbeschwertheit, ihre Lebenslust und nicht zuletzt mit ihren grandiosen Küchenfähigkeiten eine unverwechselbare Arbeitsatmosphäre geschaffen. Durch unsere räumliche Trennung verliere ich nicht nur eine großartige

Kollegin, sondern definitiv ein kleines Stück der täglichen Lebensfreude. Marion danke ich für die vielseitige und sehr wertvolle Unterstützung meiner Arbeit. Noch mehr danke ich ihr allerdings für Ihre Anteilnahme und Aufmunterung, wenn einfach mal nichts funktioniert hat. Jonna danke ich für ihre herausragende Fähigkeit, Dinge so präzise auf den Punkt zu bringen, dass ich mich so manches Mal fragte, warum ich mir jetzt so lange Gedanken gemacht hatte. Christina danke ich sehr für ihre engagierte und konstruktive Unterstützung meiner experimentellen Arbeit. Sie hat stets ein sehr großes Talent bewiesen, genau dort zu sein, wo man sie gerade brauchte. Bernadette danke ich herzlich für ihre unermüdliche Hilfe, noch mehr jedoch für ihre Fröhlichkeit, die sie so gut weitervermitteln konnte. Unsere Arbeit gestaltete sich häufig derart Hand in Hand, dass Außenstehende nicht erahnen konnten, wessen Versuch wir eigentlich gerade durchführten. Menschen wie Bernadette sind schwer zu finden und ich freue mich immer noch täglich darüber, sie als Freundin gefunden zu haben.

Stellvertretend für die langjährigen Freunde, die mich leider nicht nach München begleiten konnten und auch in stressigen Zeiten immer zumindest telefonisch zur Stelle waren, danke ich Katja, Steffi und Carsten.

Für die technische Unterstützung danke ich Heidi Zankl, Andrea Wehmeyer, Marion Fisch, Carmen Meyer und Gerhard Moll. Bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts bedanke ich mich für die freundliche und kompetente Hilfe verschiedenster Art.

Diese Studie wurde unterstützt durch das Stipendium PO 681/4-1 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)